

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude de la transduction du signal dans la keratinocytes en sénescence répllicative (SR) et en sénescence induite prématurément par les stress UVB (SIPS-UVB)

Ernst, Lysianne

Award date:
2016

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DANS LES KERATINOCYTES EN
SENESCENCE REPLICATIVE (SR) ET EN SENESCENCE INDUITE
PREMATUREMENT PAR LES STRESS UVB (SIPS-UVB)**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Lysianne ERNST

Janvier 2016

ETUDE DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DANS LES KERATINOCYTES EN SENESCENCE REPLICATIVE (SR) ET EN SENESCENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR LES STRESS UVB (SIPS-UVB)

ERNST Lysianne

Résumé

La sénescence est induite comme réponse cellulaire suite à des stress endogènes ou exogènes. Depuis sa découverte, en 1961 par Hayflick et Moorhead, elle est amplement caractérisée, chez des fibroblastes, à travers la présence de biomarqueurs de la sénescence spécifiques. Parmi ces biomarqueurs étudiés sont le changement de morphologie cellulaire, l'augmentation du pourcentage des cellules positives à l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal), les changements d'expression de gènes associés à la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire. Peu de choses sont connues sur l'expression de ces biomarqueurs lors de la sénescence des kératinocytes normaux humains, qui sont les premières cellules de la peau à être exposées à des stress environnementaux.

La première partie de ce travail consiste en l'étude de ces biomarqueurs dans des kératinocytes en sénescence répllicative (SR) et en sénescence induite prématurément par des expositions répétées à des doses subcytotoxiques d'UVB (SIPS-UVB).

La seconde partie se consacre à l'étude des voies de signalisation impliquées dans l'apparition de la sénescence induite prématurément par des stress UVB. Nous avons analysé l'apparition de dommages à l'ADN et l'activation de la voie de réparation des dommages à l'ADN (DDR) de manière persistante. De plus, la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) et l'activation de Nrf2 est investiguées.

Les résultats obtenus montrent que les deux modèles de la sénescence (SR et SIPS-UVB) induisent les mêmes biomarqueurs de sénescence, bien qu'à des degrés divers, menant à un changement de morphologie cellulaire, une augmentation du pourcentage des cellules positives à la SA- β gal, des changements d'expression de gènes associés à la sénescence et à l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, les kératinocytes en SIPS-UVB présentent des dommages à l'ADN persistants à 72h après le dernier stress. Ceci mène à l'activation de la voie de réparation des dommages à l'ADN DDR. Une augmentation de la production des ROS en SIPS-UVB a pu également être observée, ce qui semble induire la translocation nucléaire l'activation du facteur de transcription Nrf2.

MERCI

Arrivée au terme de ces 10 mois de recherches, il est temps de remercier les personnes qui m'ont accompagnée de près ou de loin !

Tout d'abord, j'aimerais remercier les Seniors de l'URBC de m'avoir accueillie au sein de leur labo et de m'avoir accordé leur confiance me permettant d'avancer dans mon apprentissage.

Je tiens à remercier très sincèrement Florence Chainiaux pour son suivi et ses précieux conseils reçus lors de la rédaction de ce travail mais surtout pour sa patience, sa compréhension et son esprit maternel qu'elle a montré durant cette année.

Also, Emilie ... grâce à toi j'ai découvert le « folklore laborantin ».

Dès les premiers jours, tu m'as prise sous ton aile et tu m'as guidée durant toute cette aventure. Malgré les quelques défis « françaisés » du début, on a vite compris comment col-LABO-rer :-)

Tu n'as jamais cessé de t'occuper de l'avancement de mon travail à tout point de vue, alors que tes tâches au bureau et, dernièrement, les Post-It sur ton ordinateur montraient bien que tu n'avais pas que ça à faire.

Merci aussi aux filles de ton « bureau de la bonne humeur » où je me suis toujours sentie la bienvenue !

Merci à l'équipe GRAS pour son aide de près et de loin et tout particulièrement à Elise pour ton soutien en fin de parcours.

Il me semble évident de remercier les autres mémorantes, Julie, Lisa et Estelle, sans lesquelles l'expérience n'aurait pas été la même. C'est avec plaisir que je repense aux nombreux moments passés au bureau, porte bien fermée, vous me comprendrez !

Je ne peux pas non plus oublier Maude et Antoine chez qui j'ai toujours pu trouver de l'aide, des conseils et des réponses à mes questions. Merci, Catherine et Noëlle pour votre patience à observer mes 763 couvre-objets et à toi, Guy, pour tes précieux services.

Enfin, un tout grand merci à toutes les personnes rencontrées durant ces 5 belles années à Namur, années qui resteront pour moi une expérience riche et inoubliable.

Je pense tout particulièrement à Romy et Maud. A nous trois, nous avons vécu de nombreuses histoires.

Finalement, merci à deux personnes chères sans lesquelles tout ceci n'aurait pas été possible. Je pense à mes parents, qui dès le premier jour ont toujours été là pour moi. Ils m'ont soutenue, coachée et accompagnée, au sens propre comme au figuré, contre vents et marées. Jusqu'à se soucier des trajets avec la SNCB... :-)

L'union fait la force !

Lysianne

Liste des abréviations

(6-4)PPs	Photoproduits de pyrimidines (6-4) pyrimidone
53BP1	p53 Binding Protein
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AP	a-purique ou a-pyrimidique
ApoJ	Apolipoprotéine J
ARE	Antioxydant respond element
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATM	Ataxia-telangiectasia
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BER	Base excision repair
BRCA1	Breast cancer type-1 susceptibility
BSA	Albumine sérique bovine (bovine serum albumine)
CDK	Kinase dépendante des cyclines (cyclin-dependent kinase)
CDKI	Inhibiteur de kinase dépendante des cyclines (CDK inhibitor)
CHK	Checkpoint kinase
CPD	Dimère de pyrimidines-cyclobutanes (cyclobutane pyrimidine dimer)
DDR	Réparation des dommages à l'ADN (DNA damage repair)
DSB	Cassure double brin (double strand break)
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Sérum de bovin fœtal (fetal bovine serum)
FN1	Fibronectine 1
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GGR	Global genome repair
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution
HCl	Chlorure d'hydrogène
IDCR	Ion detergent compatibility reagent
IF	Immunofluorescence
IGF	Acteur de croissance ressemblant à l'insuline (insulin-like growth factor)
IL	Interleukine
IR	Infrarouges
K-SFM	Keratinocyte-SFM is a serum-free medium
KC	Kératinocyte
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéase matricielle
MRN	MRE11/RAD50/NBS1

NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues
NHK	Kératinocytes normaux humains (normal human keratinocytes)
NMF	Facteurs d'hydratation naturelle
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
O_2	Oxygène
O_2^- ou $\text{O}_2^{\cdot -}$	Anion superoxide
$\cdot\text{OH}$	Radical hydroxyle
OIS	Sénescence induite par les oncogènes (oncogen induced senescence)
PBS	Tampon phosphate salin
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldéhyde
pRB	Protéine du rétinoblastome
PSNE	Emergence néoplasique post-sénescence (post-senescence neoplastic emergence)
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
rEGF	Facteur de croissance épidermique recombinant
RH	Recombinaison homologue
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène (reactive oxygen species)
RPA	Protéine de réplication A
SA- β gal	Activité de β -galactosidase associé à la sénescence (senescence associated β -galactosidase)
SAHF	Senescence Associated Hetero-chromatine Foci
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (senescence associated secretory phenotype)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SIPS	Sénescence induite prématurément par des stress
SIPS-UVB	Sénescence induite prématurément par des stress UVB
<i>t</i> -BHP	ter-butylhydroperoxyde
TCR	Transcription couplée repair
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet A
UVB	Ultraviolet B
UVC	Ultraviolet C
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WB	Western blot
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
β -gal	beta-galactosidase

Table des matières

INTRODUCTION	4
I. Le vieillissement de la population	4
II. La structure de la peau et son vieillissement	5
1. La structure de la peau	5
a. L'hypoderme	5
b. Le derme	5
c. La jonction épidermo-dermique	6
d. L'épiderme	6
2. Le vieillissement intrinsèque de la peau	9
3. Le vieillissement extrinsèque	9
III. Les dommages induits par les UV et mécanismes de réparation	10
1. Les Rayons UV	10
2. Les dommages induits par les UV	10
a. Les dommages directs à l'ADN	10
b. Les dommages indirects à l'ADN	11
3. Les mécanismes de réparations de l'ADN	11
a. Le base excision repair (BER)	12
b. Le nucleotide excision repair (NER)	12
c. La réparation des cassures double brin de l'ADN	12
d. Les mécanismes antioxydants	14
IV. Le vieillissement <i>in vitro</i>	14
1. La sénescence répllicative	14
2. La sénescence induite par les oncogènes (OIS)	15
3. La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)	15
4. Les biomarqueurs de la sénescence	16
a. Le raccourcissement des télomères	16
b. L'arrêt du cycle cellulaire	17
c. Le changement de morphologie cellulaire	18
d. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal)	18
e. La délétion de l'ADN mitochondrial	18
f. Les changements de l'expression génique associés à la sénescence	18
g. Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)	19
MATERIEL ET METHODES	22
I. Culture cellulaire	22
1. Extraction des kératinocytes humains normaux à partir de biopsies de peau	22

a. Matériel.....	22
b. Méthode.....	22
2. Culture cellulaire	22
a. Matériel.....	22
b. Méthode.....	22
II. Exposition des cellules aux UVB	23
a. Matériel.....	23
b. Méthode.....	23
III. Détection de l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence.....	23
a. Matériel.....	24
b. Méthode.....	24
IV. Extraction d'ARN, rétro-transcription et PCR en temps réel.....	24
1. Lyse cellulaire et extraction d'ARN	24
a. Matériel.....	24
b. Méthode.....	24
2. Rétro-transcription	25
a. Matériel.....	25
b. Méthode.....	25
3. PCR en temps réel	25
a. Matériel.....	25
b. Méthode.....	25
V. Extraction de protéines, dosage protéique et Western Blot	25
4. Lyse cellulaire et extraction de protéines.....	26
a. Matériel.....	26
b. Méthode.....	26
5. Dosage protéique	26
a. Matériel.....	26
b. Méthode.....	26
6. Western blot	27
a. Matériel.....	27
b. Méthode.....	27
VI. Immunofluorescence.....	27
a. Matériel.....	28
b. Méthode.....	28
VII. Mesure des ROS	28
a. Matériel.....	29
b. Méthode.....	29

VIII. Tests statistiques	29
RESULTATS	30
I. Etude des biomarqueurs de la sénescence en SR et en SIPS-UVB	30
1. Morphologie cellulaire sénescence	30
2. Activité β -galactosidase associée à la sénescence	31
3. Changement d'expression de gènes associés à la sénescence	31
4. Arrêt du cycle cellulaire	32
II. Dommages à l'ADN et activation de la voie DDR lors de la SIPS-UVB	34
1. Dommages à l'ADN détectés en SIPS-UVB	34
2. Etude de la voie DDR (DNA Damage Repair)	35
3. Détection des ROS	37
DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
BIBLIOGRAPHIE	44

INTRODUCTION

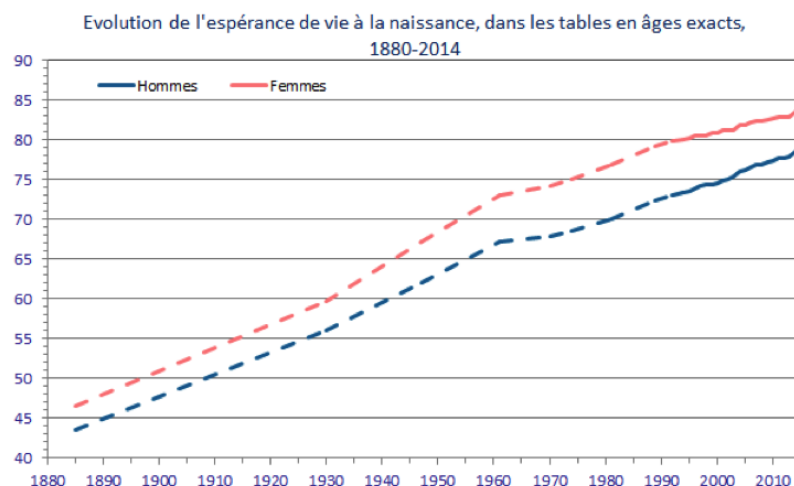


Figure I.1 : Evolution de l'espérance de vie à la naissance en Belgique de 1880 à 2014. En 1985 l'espérance de vie à la naissance en Belgique était de 43,4 ans pour les hommes et de 45,7 ans pour les femmes. Elle a augmenté ensuite pour atteindre en 1970 et finalement en 2014 respectivement l'âge de 67,3 et de 77,9 ans pour les hommes et l'âge de 73,7 et de 82,9 ans pour les femmes.

(Source : SPE économie – direction générale statistiques, http://economie.fgov.be/fr/statistiques/chiffres/population/deces_mort_esp_vie/tables/)

EU27 population by age and sex

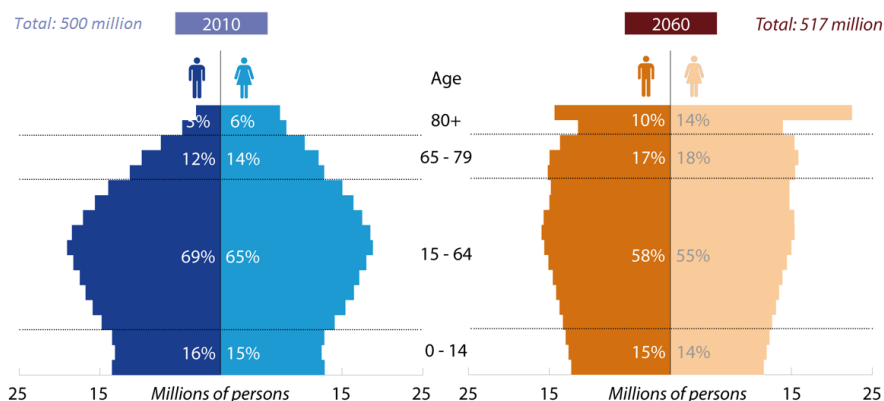


Figure I.2 : Pyramides des âges pour l'ensemble des 27 pays faisant partie de l'Union Européenne en 2010 et les prévisions pour l'année 2060. Par rapport à la population générale, le pourcentage des personnes âgées de plus de 80 ans représentait seulement 3% pour les hommes et 6% pour les femmes en 2010. Cette tranche d'âge passerait respectivement à 10% et 14% en 2060 (Source : European Parliamentary Research, <https://libraryeuroparl.files.wordpress.com/2013/12/fig-1.png>)

I. Le vieillissement de la population

Depuis un siècle, l'espérance de vie dans les pays développés augmente, entraînant un vieillissement de la population. Cela se déduit en observant les courbes d'espérance de vie à la naissance (Figure I.1) (SPE économie - direction générale statistiques). En effet, alors qu'en 1970 l'espérance de vie à la naissance en Belgique était de 67,3 ans pour les hommes et de 73,7 ans pour les femmes, elle a augmenté ensuite pour atteindre en 2014 respectivement l'âge de 77,9 et 82,9 ans. Dans les années à venir, elle ne cessera pas d'augmenter et devrait - d'après les prévisions du Bureau fédéral du Plan - atteindre en 2060 l'âge de 86,3 ans pour les hommes et 88,4 ans pour les femmes (plan.be; economie.fgov.be). Cette évolution est observée dans la plupart des pays de l'Union Européenne et a comme conséquence une modification de la pyramide des âges, qui passe d'une forme triangulaire à une forme en « tonneau » (Figure I.2). Ceci implique que le pourcentage des personnes âgées de plus de 80 ans augmente fortement par rapport à la population générale. Alors que cette tranche d'âge, par rapport à la population générale, représentait seulement 3% pour les hommes et 6% pour les femmes en 2010, elle passera respectivement à 10% et 14% en 2060 (Figure I.2). Ces changements démographiques ne sont pas uniquement le résultat de l'augmentation de l'espérance de vie, mais sont aussi la réponse à une baisse de fécondité. Ce vieillissement de la population entraîne des conséquences en termes d'économie, de politique des retraites mais surtout en termes de soins et de santé et de prise en charge des personnes âgées (sources : plan.be; economie.fgov.be).

En effet, les personnes deviennent plus fragiles avec l'âge. La fragilité est définie comme étant la diminution des réserves physiologiques, nécessaires à répondre à des situations différentes, ou encore la dysrégulation de plusieurs systèmes (Fried et al., 2001). Ceci expose l'individu à un risque accru d'une santé défavorable ou à un déclin fonctionnel. En effet, en vieillissant, des altérations apparaissent dans les organes et tissus des personnes âgées. Ceci mène à l'apparition de maladies liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'hypertension ou encore des maladies cardiovasculaires (Adams, 2009). De plus, il est souvent observé que les personnes âgées perdent la capacité de vivre seule et de manière autonome sans handicap (Lipsitz, 2002).

Il est donc important de faire des progrès en gériatrie, partie de la médecine qui étudie la santé et les pathologies liées à l'âge, ainsi qu'en gérontologie, partie de la science qui étudie les mécanismes du vieillissement. Pour ce faire, de nombreuses études sont menées sur des groupes de personnes âgées, comme le protocole SENIEUR ou l'étude MARK-AGE (Burkle et al., 2015, Ligthart et al., 1984). Mais celles-ci ne permettent pas de comprendre tous les mécanismes du vieillissement. C'est pour cela que de nombreuses études sur des organismes modèles plus simples tels que *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* ou encore *Macaca matala* sont réalisées (Fontana et al., 2010). En plus des organismes modèles, des recherches *ex vivo*, sur des biopsies de peau par exemple, ou encore en cultures cellulaires *in vitro* sont également nécessaires afin de mieux comprendre le vieillissement et les mécanismes de la sénescence. Tous ces progrès ayant comme but final d'ajouter non pas des années à la vie mais de la vie aux années (Organisation mondiale de la santé).

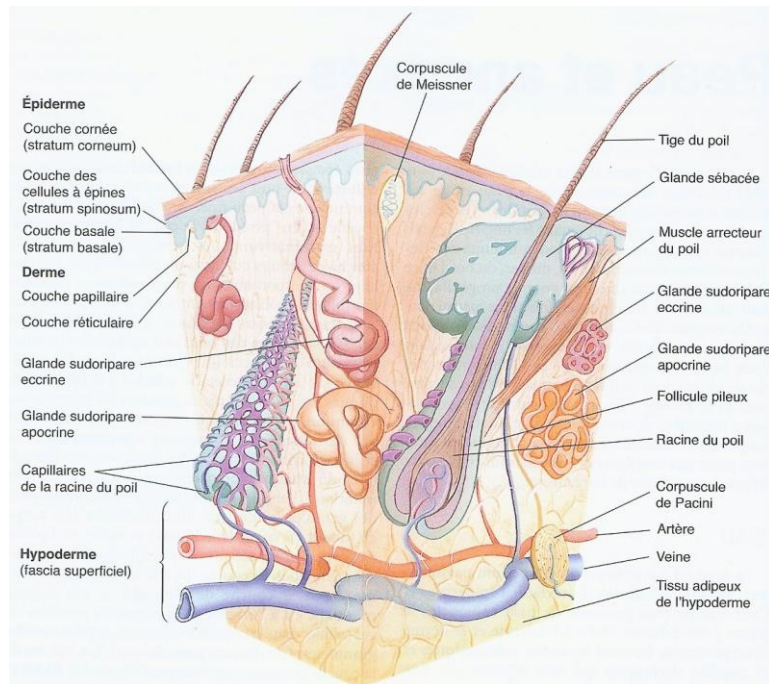


Figure I.3 : Représentation schématique des différentes couches de la peau. La peau est composée de trois couches : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Le derme est divisé en deux couches : les couches papillaire et réticulaire. L'épiderme est composé de quatre couches : les couches basale, épineuse, granuleuse et cornée. De plus, plusieurs annexes cutanées sont observées dans le derme comme les follicules pileux ou poils, des terminaisons nerveuses (corpuscules de Meissner, de Vater Pacini), des glandes sudoripares et sébacées ainsi que des ongles et des vaisseaux sanguins et lymphatiques (pas toutes représentées) (Hiatt, 2012).

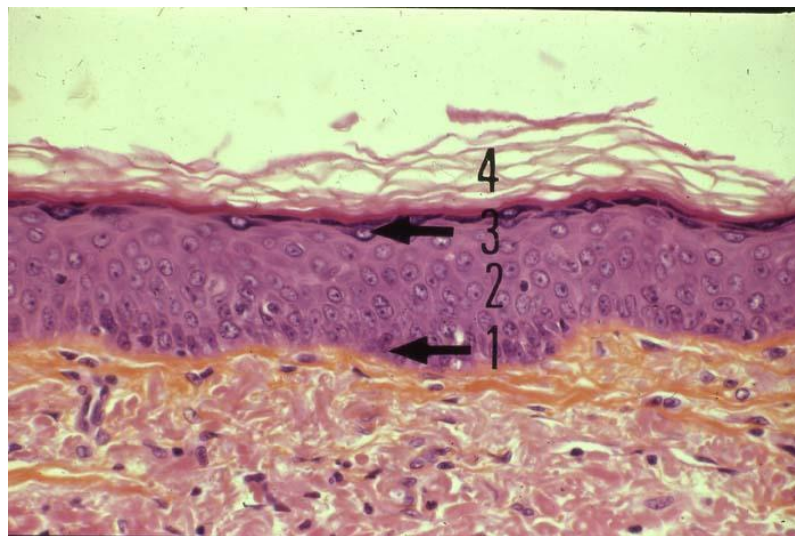


Figure I.4 : Photographie d'une section de peau en microscopie photonique en coloration de Hémalum-Erythrosine-Safran. Cette photographie montre le derme et l'épiderme. Au sein de l'épiderme, on observe en 1 la couche basale, en 2 la couche épineuse en 3, la couche granuleuse et en 4, la couche cornée. (Source : Rose Thibaut, Grégoire Vincke, Eric Depiereux, Martine Raes, Atlas d'Histologie humaine et animale, épithéliums stratifiés - coupe 21, <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/>).

II. La structure de la peau et son vieillissement

La peau est un excellent modèle d'étude du vieillissement, car cet organe de structure complexe joue le rôle de barrière physique en protégeant le corps des stress externes. Le vieillissement de la peau est induit par deux composantes différentes : le vieillissement intrinsèque ainsi que le vieillissement extrinsèque, lié à ces stress externes.

1. La structure de la peau

La peau est un organe complexe qui recouvre l'entièreté du corps humain. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'on l'appelle également tégument (du latin tégument : couverture). Avec une surface d'environ 2 m² (pour un homme adulte) et un poids représentant 15% du poids corporel, elle est le tissu le plus vaste de l'organisme (Freinkel, 2001). La peau a une épaisseur variable en fonction de sa localisation, allant de 0,1 à 0,3 mm aux paupières et aux contours des yeux jusqu'à de 1,2 à 4 mm pour la paume des mains et la plante des pieds (Kanitakis, 2002). La peau assume des fonctions vitales, dont la principale est la barrière physique. En effet, la peau est en contact direct avec le monde extérieur et nous protège ainsi de ses agressions chimiques (substances toxiques), physiques (rayons UV) et biologiques (micro-organismes) (Gunathilake, 2015). Elle régule également la température corporelle par l'intermédiaire des glandes sudoripares, des capillaires sanguins du derme et des poils de la peau. De plus, la peau est un organe possédant une fonction immunitaire, une fonction sensorielle, ainsi qu'un rôle de stockage de graisses et de production de la vitamine D (Freinkel, 2001).

La peau est constituée de trois couches différentes qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur, l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure I.3 et Figure I.4). Ces deux derniers sont séparés par une membrane basale ou jonction épidermo-dermique. Ces couches sont composées de plusieurs types cellulaires différents avec des rôles spécifiques, permettant ainsi à l'organe d'assurer ses nombreuses fonctions (Hiatt, 2012). On retrouve également de nombreuses annexes dermiques telles que les glandes sébacées, les glandes sudoripares, les poils et les ongles. Ces annexes ainsi que l'épiderme proviennent d'une origine ectodermique alors que l'hypoderme et le derme proviennent d'origines mésodermiques (Hiatt, 2012).

a. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau (Figure I.3). Il est en contact avec l'aponévrose, membrane enveloppant les muscles, et le périoste, couche externe des os (Kanitakis, 2002). L'hypoderme, hautement vascularisé, est principalement constitué d'adipocytes séparés par du tissu conjonctif lâche, composé entre autre de collagène et d'élastine (Crickx, 2005). Les lipides (triglycérides et acides gras) contenus dans les adipocytes constituent une réserve énergétique, mais assurent aussi une isolation thermique et une protection contre les chocs mécaniques (Freinkel, 2001).

b. Le derme

Le derme est la couche située entre l'hypoderme et l'épiderme (Figure I.3). Le derme est un tissu conjonctif élastique, composé de cellules et d'une matrice extracellulaire (MEC). Les cellules composant le derme sont des fibroblastes, des cellules dendritiques dermiques ou encore des mastocytes (Freinkel, 2001). La MEC est constituée de fibres de collagène et

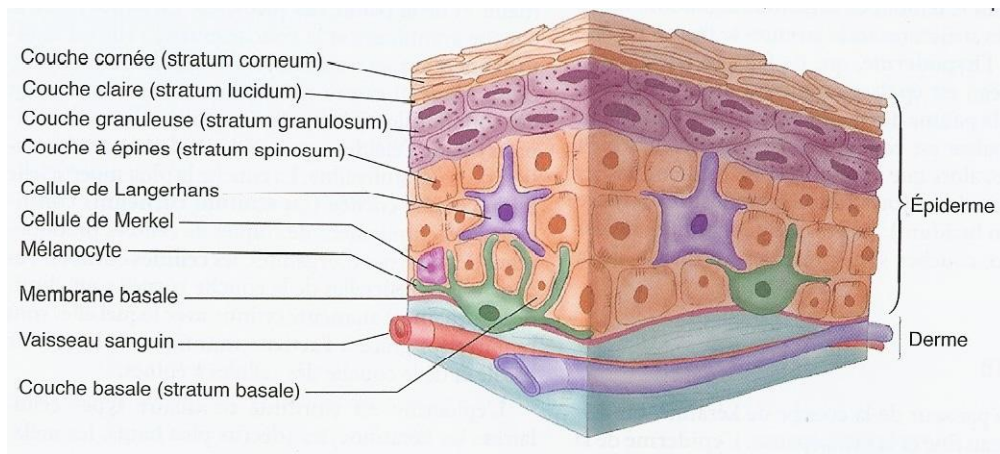


Figure I.5 : Représentation schématique des différentes cellules et couches composant l'épiderme. L'épiderme, séparé du derme par la membrane basale, est composé principalement de quatre types cellulaires, les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langerhans, arrangés en plusieurs couches, les couches basale, épineuse, granuleuse et cornée (Hiatt, 2012).

d'élastine ainsi que de macromolécules (protéoglycans et glycoprotéines) (Wlaschek et al., 2001).

Les fibroblastes sont les cellules fondamentales du derme et sont responsables de la synthèse et de la dégradation des composants de la MEC, menant ainsi à un turnover continu du derme (Kanitakis, 2002). Les fibres de collagène, principalement de types I et III, représentent 70% de la masse sèche de la peau. Elles lui procurent la résistance mécanique (James and Kligman, 2006). Les fibres d'élastine confèrent la souplesse et l'élasticité de la peau et permettent l'ancrage de la peau à l'hypoderme (Hiatt, 2012). Les macromolécules (protéoglycans et glycoprotéines) remplissent l'espace entre les fibres et les cellules. Les macromolécules permettent d'organiser la MEC, servent de support à la migration des cellules et ont un rôle dans l'hydratation de la peau (Wlaschek et al., 2001).

Le derme est divisé en deux couches : une couche superficielle nommée couche papillaire, et une couche plus profonde, nommée couche réticulaire. La couche papillaire présente un tissu conjonctif plus lâche et orienté le plus souvent perpendiculairement par rapport à la membrane basale. Elle forme des replis, nommés les papilles dermiques, qui sont en contact avec des prolongements épidermiques, nommés les crêtes épidermiques. Elles permettent l'ancrage entre derme et épiderme (Kanitakis, 2002). Contrairement à la couche papillaire, la couche réticulaire est plus dense, plus épaisse et est composée de fibres non orientées (James and Kligman, 2006). C'est dans le derme que l'on retrouve les annexes cutanées comme les follicules pileux, des terminaisons nerveuses (corpuscules de Meissner, de Vater Pacini), des glandes sudoripares ou sébacées ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques (James and Kligman, 2006). En plus de la régulation thermique, les vaisseaux sanguins permettent d'une part l'apport de nutriments et d'oxygène et d'autre part l'élimination des déchets et de dioxyde de carbone. Les vaisseaux lymphatiques sont importants dans la régulation de la pression et le drainage du liquide interstitiel (James and Kligman, 2006).

c. La jonction épidermo-dermique

La jonction épidermo-dermique, séparant le derme de l'épiderme, est aussi nommée lame ou membrane basale (Figure I.5). Elle est constituée entre autre de collagène de type IV et de fibrilles d'ancrage, sécrétées soit par les kératinocytes de l'épiderme soit par les fibroblastes du derme (Kolarsick, 2011). La membrane basale assume plusieurs rôles. Par l'intermédiaire de complexes d'ancrage, elle permet l'ancrage de l'épiderme avec le derme (Crickx, 2005). Un second rôle est la détermination de la polarité des kératinocytes basaux ainsi qu'une organisation spatiale des kératinocytes assurant une structuration de l'épiderme en différentes couches. Elle assure également un soutien lors de l'adhésion et de la migration des kératinocytes ainsi que lors de la reconstruction de l'épiderme au cours de la cicatrisation. Enfin, la lame basale assure le rôle de barrière sélective contrôlant le passage de molécules ou de cellules entre le derme et l'épiderme (Breitkreutz et al., 2009).

d. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (Hiatt, 2012) (Figure I.4 et Figure I.5). Il s'agit de la couche la plus externe de la peau. L'épiderme est composé de kératinocytes, de mélanocytes, de cellules de Merkel et de cellules de Langerhans, arrangés en plusieurs couches (Figure I.5) (Kanitakis, 2002).

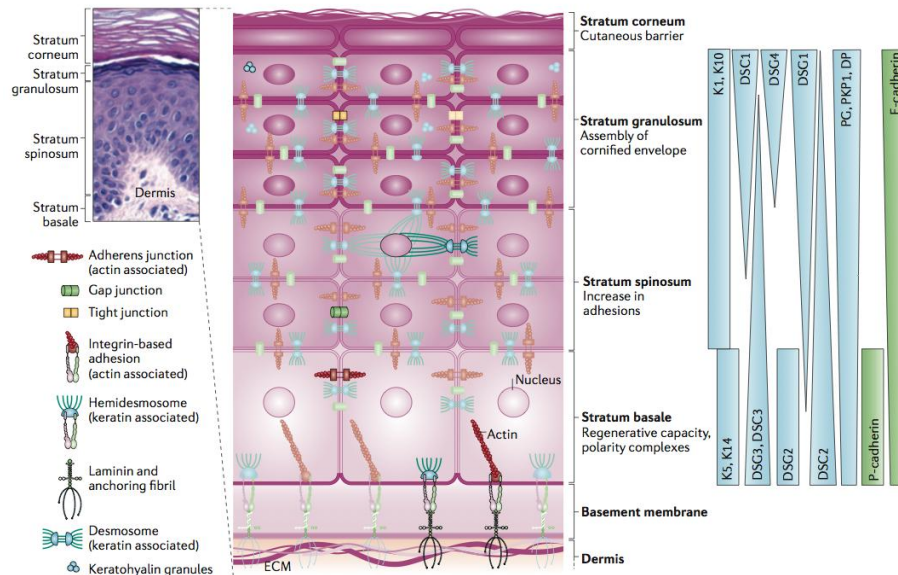


Figure I.6 : Représentation schématique de la différenciation des kératinocytes au sein de l'épiderme. Les cellules de la membrane basale ont une capacité proliférative et expriment les kératines K5 et K14. Les cellules de la couche épineuse ont une forme d'épine et expriment les marqueurs de différenciation, K1 et K10. En progressant, les kératinocytes présentent une morphologie plus large et aplatie jusqu'à atteindre le stade de différenciation terminale en cornéocytes (Simpson et al., 2011).

- Les cellules composant l'épiderme

Les **kératinocytes** représentent 90% de l'épiderme et sont responsables de la kératinisation de la peau (Kanitakis, 2002). Ils ont une forme régulière et polyédrique et sont de petite taille (10 à 20 μm) (Soroka et al., 2008). Ils subissent des modifications phénotypiques au cours de leur différenciation. Durant celle-ci, une phase de synthèse suivie d'une phase de dégénération est observée. En effet, la couche la plus externe de l'épiderme est formée de kératinocytes morts, également appelés cornéocytes (James and Kligman, 2006).

Les **mélanocytes** sont responsables de la production de la mélanine. Ils proviennent des crêtes neurales et se retrouvent principalement dans la lame basale au nombre d'un mélanocyte pour 4 à 10 kératinocytes (Kolarsick, 2011). Ils présentent une forme étoilée, et leurs ramifications entrent en contact avec les kératinocytes. Ces contacts permettent la transmission des mélanosomes, petits organites contenant la mélanine, aux kératinocytes. Au sein des kératinocytes, la mélanine forme une couche protectrice autour des noyaux, protégeant ainsi le matériel génétique contre les rayons UV (Tagashira et al., 2015). Lors d'expositions importantes et répétées aux rayons UV, la mélanogenèse et le transfert des mélanosomes augmentent, résultant en une capacité plus élevée des cellules à absorber la lumière et donc à protéger l'ADN (Tagashira et al., 2015).

Les **cellules de Merkel** sont des mécanorécepteurs (récepteurs du toucher). Ceux-ci sont localisés dans la couche basale de régions sensibles telles que le bout des doigts ou encore les lèvres (Hiatt, 2012). Ces cellules de petite taille sont caractérisées par un noyau volumineux et plurilobé, et présentent dans leur cytoplasme de nombreux granules neurosécrétoires. De plus, elles synthétisent un grand nombre de neuromédiateurs et jouent ainsi un rôle central dans le système neuro-endocrino-immuno-cutané (Hiatt, 2012). Elles sont rattachées aux kératinocytes par l'intermédiaire de desmosomes. Ainsi, une légère déformation des kératinocytes avoisinants suffit pour être perçue par les cellules de Merkel et pour envoyer des stimuli nerveux au cerveau (Kolarsick, 2011).

Les **cellules de Langerhans** ou cellules dendritiques sont originaires de la moelle osseuse. On les retrouve principalement au sein de la couche épineuse dans laquelle elles sont mobiles et circulantes (Kanitakis, 2002). Ces cellules sont des présentatrices d'antigènes, qui seront capables d'induire une réponse immunitaire adaptative. En effet, après l'endocytose d'un antigène, les cellules de Langerhans vont quitter l'épiderme pour atteindre les ganglions lymphatiques et permettre ainsi l'activation de cellules T naïves (Kissenpfennig et al., 2005).

- Les différentes couches de l'épiderme et la kératinisation

L'épiderme est organisé en 4 couches, qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur, les couches basale, épineuse, granuleuse et cornée. Les kératinocytes migrent à travers ces 4 couches lors de leur différenciation et le processus dure 28 jours (Figure I.6) (Chu, 2008).

La **couche basale** (*stratum germinativum*) est la couche proliférative de l'épiderme. En effet, l'activité mitotique des cellules souches épidermiques de la membrane basale donne naissance aux kératinocytes composant les autres couches de l'épiderme. La couche basale est composée d'une assise de cellules cubiques ou prismatiques caractérisées par un noyau ovale entouré d'une « cape » de mélanine. Leur cytoplasme contient des filaments libres de tonofilaments, composés de kératine K5 et K14 (Kanitakis, 2002). Ces filaments sont attachés aux hemidesmosomes ou desmosomes, les premiers permettant une cohésion étroite entre kératinocytes et la membrane basale et les seconds une cohésion étroite des cellules basales

entre elles (Simpson et al., 2011). Notons que dans le cas particulier de la cicatrisation on observe une prolifération beaucoup plus importante des kératinocytes de la couche basale (Blanpain and Fuchs, 2009).

La **couche épineuse** (*stratum spinosum*) présente une épaisseur variable allant de 5 à 10 couches de cellules (Kanitakis, 2002). En progressant au sein de la couche granuleuse, les kératinocytes présentent une morphologie différente en fonction de leur stade, de différenciation et de leur localisation (Chu, 2008). En effet, les kératinocytes situés dans le bas de la couche (à proximité de la couche basale) présentent une forme polyédrique et un noyau de forme arrondie, tandis que les kératinocytes se trouvant plus haut dans la couche épineuse (à proximité de la couche granuleuse) ont une forme plus large, aplatie et sont reliés entre eux par de nombreux desmosomes. Ceci permet un attachement mécanique entre les cellules et promeut une résistance aux stress physiques. Cette morphologie en forme d'épine, présentée par les kératinocytes, donne son nom à cette couche épineuse (Chu, 2008). De plus, des jonctions communicantes entre les kératinocytes sont également observées, permettant une communication intercellulaire afin de réguler le métabolisme, la croissance et la différenciation des kératinocytes (Kanitakis, 2002). Au sein du cytoplasme, on observe une organisation des filaments intermédiaires de kératines K1 et K10 en faisceaux et l'apparition des granules lamellaires ou corps d'Odland (Chu, 2008). Il s'agit d'organelles contenant des glycoprotéines, glycolipides, phospholipides, stérols libres ainsi qu'un grand nombre d'hydrolases (lipases, protéases, phosphatases, glycosidases). Le rôle de ces granules lamellaires est de relâcher des lipides dans l'espace intercellulaire au sein de la couche cornée, jouant ainsi un rôle de barrière et de ciment pour l'épiderme (Gunathilake, 2015).

La couche granuleuse (*stratum granulosum*), montre une épaisseur variable suivant la localisation. En effet, son épaisseur peut être jusqu'à 10 fois plus importante pour l'épiderme de la paume des mains et de la plante des pieds (Kolarsick, 2011). Il s'agit de la couche la plus superficielle contenant encore des cellules vivantes. Les kératinocytes de cette couche sont de forme aplatie, et, suite à une haute activité lysosomale, leur noyau ainsi que leurs organites sont détruits. Ceci prépare les cellules à subir une différenciation terminale, comme observée dans la couche cornée (Kanitakis, 2002). Les cellules de la couche granuleuse sont responsables de la synthèse et de la modification de protéines intervenant lors de la kératinisation. En effet, leur cytoplasme est rempli de granules de kératohyaline, ou profillagrine, nécessaires à la formation des matrices interfibrillaires de fillagrines soutenant les filaments intermédiaires de kératines (Chu, 2008). Les cellules sont également liées par des jonctions étanches composées d'occludines et de claudines assurant l'étanchéité de la peau (Simpson et al., 2011).

Au niveau de la plante des pieds et de la paume des mains, l'épiderme présente une fine couche supplémentaire entre la couche granuleuse et la couche cornée ; la **couche claire** (*stratum mucidum*). Cette couche claire est composée de quelques cellules claires sans noyau ni organites (Hiatt, 2012).

La couche la plus externe de l'épiderme est la **couche cornée** (*stratum corneum*). Elle est composée d'un empilement de 15 à 20 couches de cornéocytes et elle est en contact direct avec le monde externe (Kanitakis, 2002). Les cornéocytes, de forme large, aplatie et polyédrique, sont des kératinocytes morts dépourvus de noyau et d'organites. Ils présentent un épaissement de la face interne de la membrane cytoplasmique, composée d'involucrine et de loricrine, et sont remplis de filaments intermédiaires fixés entre eux par la fillagrine (Chu, 2008). Les cellules sont entourées d'une matrice extracellulaire riche en lipides, en particulier

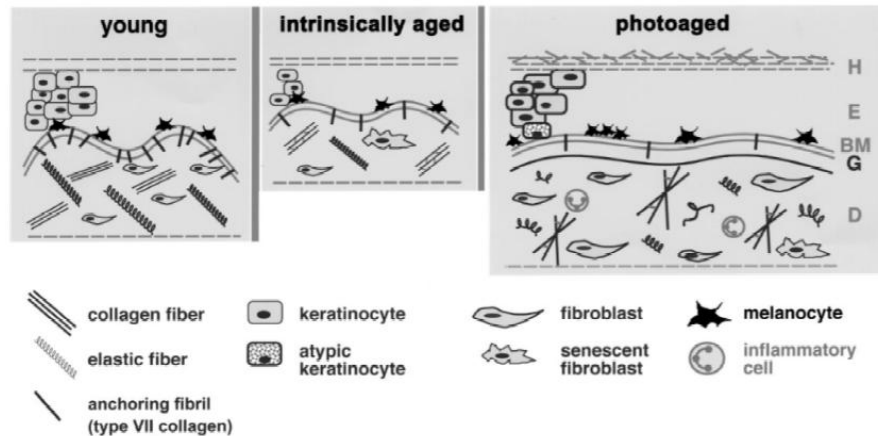


Figure I.7 : Représentation schématique de l'aspect d'une peau jeune (young), une peau âgée de manière intrinsèque (intrinsically aged) ou de manière extrinsèque (photoaged). La peau vieillissant de manière intrinsèque et comparée à la peau jeune est caractérisée par un aspect lisse et plus fin alors que la peau, vieillissant de manière extrinsèque, est plus épaisse. (H : couche cornée, E : épiderme, BM : membrane basale, G : 'Grenzzone' zone contenant des fibres de collagène intactes, D : derme) (Wlaschek et al., 2001).

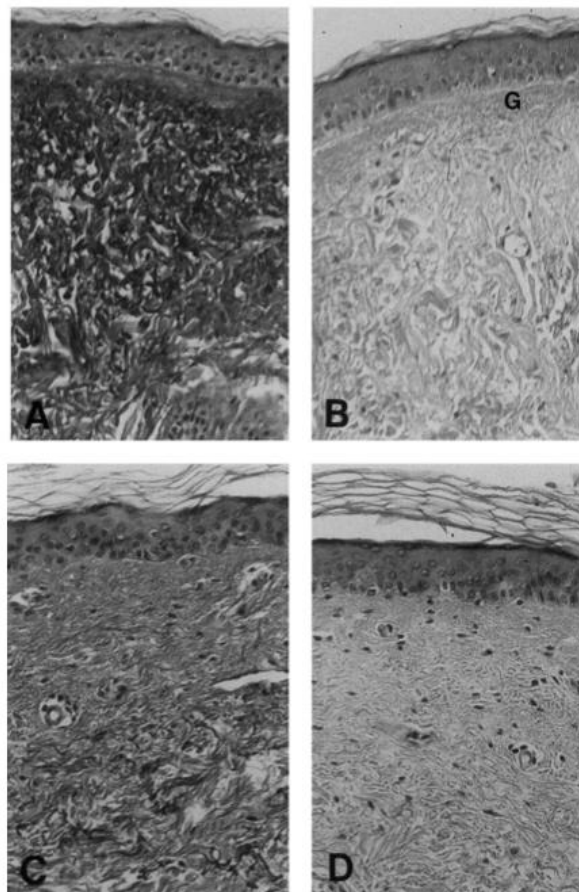


Figure I.8 : Photographies histologiques de peaux âgées de manière extrinsèque (A et B) ou de manière intrinsèque (C et D). Les images A et B, respectivement colorées à la coloration de van Gieson et à la coloration d'hémaréosine, montrent la désorganisation des fibres d'élastine (A) et la dégradation des fibres de collagène par les protéases matricielles (B). Les images C et D, respectivement colorées à la coloration de van Gieson et à la coloration d'hémaréosine, montrent une destruction plus légère des fibres d'élastine (C) et une diminution dans l'épaisseur des fibres de collagène (D) (Wlaschek et al., 2001).

des céramides et cholestérols, qui forment le mortier. Ce dernier permet de lier les cellules mortes entre elles, de maintenir l'hydratation de la peau et d'éviter la pénétration de substances externes au sein de l'organisme (Chu, 2008).

La couche cornée est divisée en deux couches : la *stratum compactum*, qui reprend la couche inférieure composée de cornéocytes compacts, et la *stratum disjonctum*, qui reprend la couche desquamante. Dans cette deuxième couche, les cellules sont continuellement éliminées par desquamation, via l'action de protéases, clivant les desmosomes (Freinkel, 2001). Finalement, les cellules jouent différents rôles en fonction de leur position. Alors que les cornéocytes situés le plus à l'extérieur procurent une protection contre l'invasion de corps étrangers, ceux, situés plus au centre, sont responsables de l'hydratation de la peau. Cette hydratation se fait par l'intermédiaire de facteurs d'hydratation naturelle (Natural Moisturizing Factor ou NMF). Il s'agit de molécules hygroscopiques telles que les acides aminés, l'acide hyaluronique ou encore des glycérols. Ces molécules sont situées dans le cytoplasme des cornéocytes et vont piéger l'eau lorsque celle-ci pénètre dans les cellules (Rawlings and Matts, 2005).

2. Le vieillissement intrinsèque de la peau

Le vieillissement intrinsèque est déterminé de manière génétique. Il s'agit du déclin tissulaire observé lorsque les tissus perdent leur fonction et leur structure (Baumann, 2007).

La peau, vieillissant de manière intrinsèque, est caractérisée par un aspect lisse et affiné (Figure I.7 et Figure I.8). En effet, le derme et l'épiderme s'atrophient, et un aplatissement des crêtes épidermiques est observé. De plus, les fibroblastes sont réduits en nombre et présentent une morphologie et un phénotype sénescents (cfr IV.4) (Wlaschek et al., 2001).

Par ailleurs, la MEC est également dégradé. Ceci est le résultat d'une diminution et d'une dérégulation de la synthèse de ces composants (fibres de collagène et d'élastine), mais aussi d'une augmentation de l'expression de protéases (MMP) qui dégradent ces composants. Ceci résulte en une dégradation des fibres d'élastine rendant la peau moins élastique (Wlaschek et al., 2001).

3. Le vieillissement extrinsèque

Au vieillissement intrinsèque se superpose le vieillissement extrinsèque, induit par des stress externes, tels que l'exposition aux rayons solaires (Baumann, 2007), le tabagisme (Yin et al., 2000), l'alcoolisme (Kostovic and Lipozencic, 2004), la malnutrition (Heilskov et al., 2015) ou encore la pollution de l'air (Vierkotter et al., 2010). Alors que ces différents types de stress contribuent au vieillissement extrinsèque de la peau, celui-ci est néanmoins principalement induit par l'exposition aux rayons solaires et est ainsi nommé photovieillissement (Baumann, 2007).

Ce vieillissement induit des changements tels que la sécheresse de la peau (Kostovic and Lipozencic, 2004), les pertes de la tonicité et de l'élasticité et l'apparition de rides profondes, suite au non-renouvellement des cellules de la peau (Yin et al., 2000) (Figure I.7 et Figure I.8). Les vaisseaux sanguins se fragilisent, menant à l'apparition de taches hémorragiques pourpres et à la diminution en oxygène et en nutriments. La distribution des mélanocytes devient irrégulière, menant à l'apparition de taches pigmentées (Wlaschek et al., 2001). De plus, on observe une hyperplasie des cellules menant à l'épaississement du derme et de l'épiderme ainsi qu'une légère hyperkératose, nommée néoplasme cutané (Wlaschek et al., 2001).

Le vieillissement extrinsèque induit également une perturbation au niveau de la MEC suite à la synthèse d'enzymes de dégradation comme la collagénase-1 (MMP-1) (Yin et al., 2000).

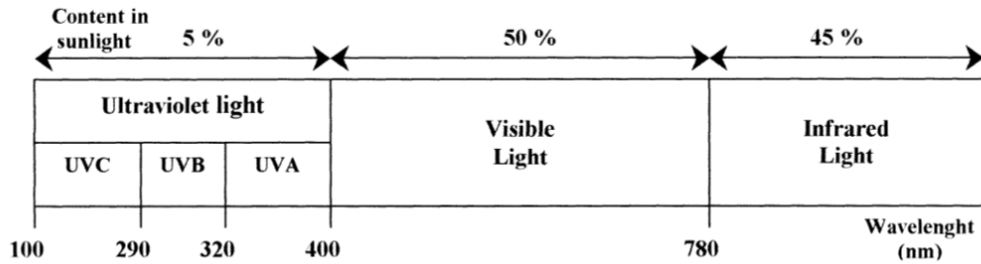


Figure I.9 : Représentation schématisée du spectre du rayonnement solaire. Les rayons solaires sont composés de trois types de rayons. On y retrouve 5% d'ultraviolets (UV) composés d'UVC, d'UVB et d'UVA, 50% de lumière visible et 45% de lumière infrarouge (IR) (Svobodova et al., 2006).

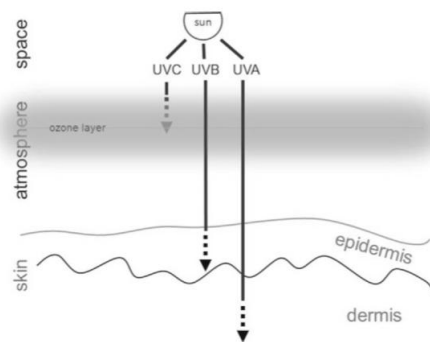


Figure I.10 : Représentation schématisée de la pénétration des ultraviolets à travers l'atmosphère et dans la peau. Alors que les rayons UVC sont arrêtés par la couche d'ozone, les rayons UVB et UVA atteignent la terre. Les UVB sont arrêtés au niveau du derme supérieur alors que les UVA atteignent le derme inférieur (Kammeyer and Luiten, 2015).

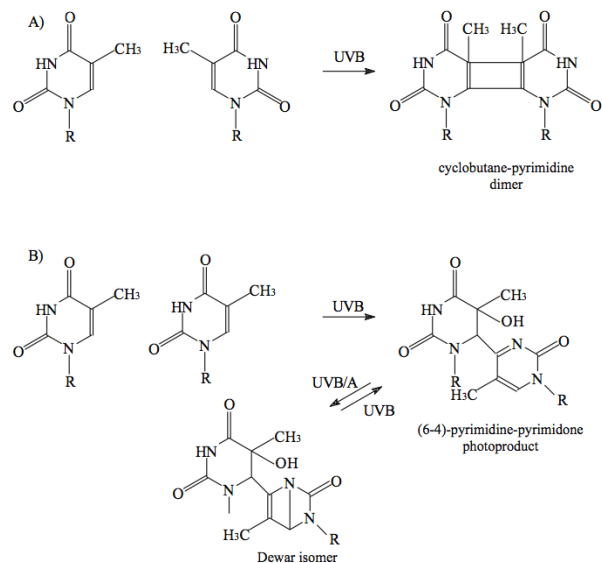


Figure I.11 : Dommages directs induits à l'ADN par interaction avec des rayons UVB. L'absorption des UVB par l'ADN mène à l'apparition de photoproduits dimériques, tels que les dimères de pyrimidines cyclobutanes (CPD) (A) ou les photoproduits de pyrimidines (6-4) pyrimidone ((6-4)-PP) (B) (Svobodova et al., 2006).

Cette dernière clive le collagène de type I composant principal de la MEC, causant une désorganisation et destruction des fibres de collagène, qui se retrouvent sous forme clivée (Wlaschek et al., 2001).

III. Les dommages induits par les UV et mécanismes de réparation

1. Les Rayons UV

Le rayonnement solaire se compose d'ondes électromagnétiques composées de trois types de rayons différents (Figure I.9) : les ultraviolets (UV), la lumière visible et les infrarouges (IR). Cette classification se fait en fonction de la longueur d'onde qui est inversement proportionnelle au niveau énergétique (Kammeyer and Luiten, 2015). Les UV, composant 5% du rayonnement solaire, possèdent une longueur d'onde courte. Ils sont donc très énergétiques. Parmi ces rayons, on retrouve les UVC (200 - 290 nm), les UVB (290 - 320 nm) et les UVA (320 - 400 nm). Comme la couche d'ozone stoppe les rayons de longueur d'onde courte (UVC et une partie des UVB), les rayons UV atteignant la surface de la terre sont constitués de 95% d'UVA et de 5% d'UVB (Figure I.10) (Parisi and Turner, 2006).

2. Les dommages induits par les UV

L'exposition de la peau aux UVA et aux UVB induit des dommages au sein de celle-ci. En effet, ces rayons traversent l'épiderme et, en ce qui concerne les UVA, atteignent le derme inférieur, alors que les UVB s'arrêtent au derme supérieur (Sindhu et al., 2003).

Les UVA sont responsables du bronzage de la peau. En effet, ils induisent la production de la mélanine au sein de mélanocytes (Clydesdale et al., 2001). Toutefois, une exposition plus intense peut mener à des brûlures pour des peaux sensibles et induire le photovieillissement dans tous les types de peau (Afaq and Mukhtar, 2001). Au niveau des cellules, les UVA provoquent des dommages à l'ADN par réaction indirecte (Pattison and Davies, 2006).

Les UVB, avec une énergie 1000 fois plus importante que les UVA, sont responsables des coups de soleil (Trautinger, 2001). Ils induisent une production de radicaux libres, par interaction avec des macromolécules photosensibles (Svobodova et al., 2006) et causent des dommages à l'ADN par réaction directe et indirecte (Pattison and Davies, 2006).

Ces dommages vont activer, au sein des cellules, des voies de signalisation qui sont liées à l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire ou la sénescence (Ravanat et al., 2001).

a. Les dommages directs à l'ADN

Les dommages directs sont occasionnés lorsque les UVB interagissent et transfèrent leur énergie à des chromophores tels que des molécules d'ADN. En effet, l'ADN est capable d'absorber les photons d'une longueur d'onde de 260 nm (Markovitsi et al., 2010). Cette absorption mène à l'apparition de photoproduits dimériques par formation de liens covalents entre deux bases pyrimidiques adjacentes. Parmi les photoproduits, on peut citer les dimères de pyrimidines cyclobutanes (CPD) ou les photoproduits de pyrimidines ((6-4) pyrimidone ((6-4)PPs) (Figure I.11) (Ravanat et al., 2001). Ces dimères causent de nombreuses mutations. En effet, les dimères des thymine-cytosine (T-C) et les dimères de cytosine-cytosine (C-C) provoquent des transitions de type T-C \rightarrow T-T et C-C \rightarrow T-T. Ces mutations sont fréquemment observées dans les gènes de p53 au sein de cellules cancéreuses comme les

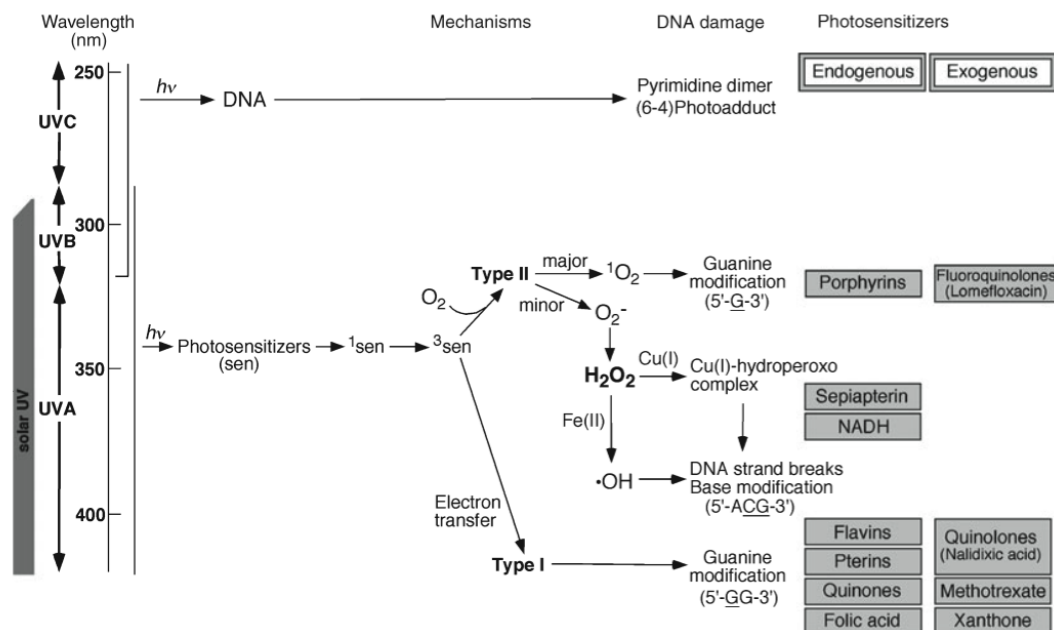


Figure I.12 : Dommages directs et indirects induits à l'ADN par interaction des rayons UVB ou UVA. L'interaction directe des UVB avec l'ADN mène à la formation de photoproduits dimériques (CPD et (6-4)PP). Les dommages indirects à l'ADN, se produisent par interaction des rayons UV avec des molécules photosensibles. Ces molécules, dans un état excité, transfèrent l'électron soit de manière directe à l'ADN (mécanisme de type I), soit à une molécule d'oxygène, conduisant à la formation d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS). Parmi ces ROS, l'oxygène singlet peut interagir et induire des dommages à l'ADN (mécanisme de type II majeur) ou être transformé en d'autres ROS interagissant eux aussi avec l'ADN (mécanisme de type II mineur) (Hiraku et al., 2007).

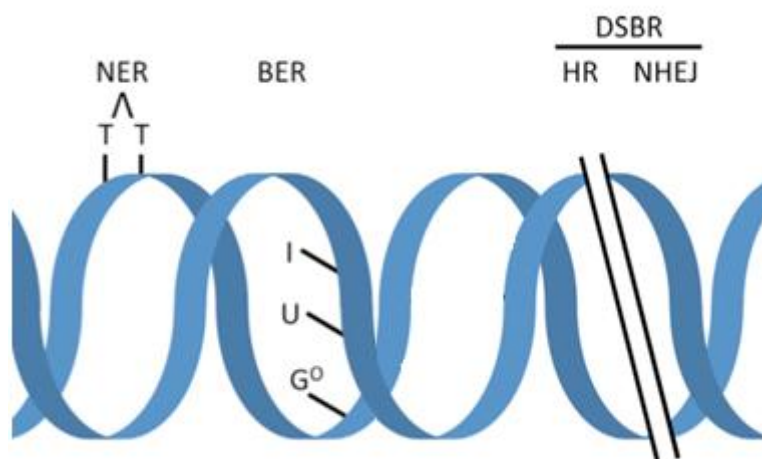


Figure I.13 : Représentation schématique des dommages induits à l'ADN et des mécanismes de réparation. Le nucleotide excision repair (NER) permet la réparation de lésions, telles que les CPDs et (6-4)PPs, induisant une distorsion dans la chaîne de l'ADN. Le base excision repair (BER) permet d'exciser et de réparer des modifications au niveau des bases de l'ADN, telles que l'oxydation, l'alkylation et la déamination des bases. Les cassures doubles brins (DSBR) sont généralement réparées par recombinaison homologue (RH) ou par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) (Svobodova et al., 2006).

carcinomes (Daya-Grosjean et al., 1995). De plus, les dimères inhibent la progression de la transcription, suite à une torsion du brin d'ADN, de la polymérase ainsi qu'un arrêt de la réplication de l'ADN.

Notons que les photoproduits (6-4)PPs sont moins mutagènes que les CPDs et sont moins fréquents puisqu'ils apparaissent à une fréquence 5 fois plus faible (Eveno et al., 1995). De plus, ils sont mieux réparés que les CPDs étant donné qu'ils induisent une torsion plus importante de l'ADN (Nakagawa et al., 1998).

b. Les dommages indirects à l'ADN

Les dommages indirects résultent de réactions entre les rayons UVB ou UVA et des molécules photosensibles, telles que le NADH/NADPH, la riboflavine, la porphyrine ou encore le tryptophane (Figure I.12) (Hanson and Simon, 1998). Les molécules se trouvant dans un état excité peuvent induire les dommages par deux voies majeures : les réactions de type I et les réactions de type II (Ito et al., 2007).

Lors des réactions de type I, les molécules photosensibles excitées vont créer des radicaux libres par interaction directe avec d'autres molécules, telles que les bases de l'ADN, sans l'intervention d'oxygène (Misiaszek et al., 2004). Cette interaction dépend du potentiel oxydatif des bases de l'ADN ainsi que du potentiel réducteur des molécules photosensibles. Parmi les quatre bases de l'ADN, la guanine est celle qui présente le potentiel oxydatif le plus bas. Son oxydation mène à la création de lésions oxydatives telle que la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) (Hiraku et al., 2007). Lors de la réplication de l'ADN, la 8-oxodG va s'apparier avec une adénine, au lieu d'une cytosine, menant à une transition mutagène G : C → T : A.

Lors des réactions de type II, l'énergie, transférée d'une molécule photosensible à une molécule d'oxygène, conduit à la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène (reactive oxygen species ou ROS). Parmi les réactions de type II, on distingue les réactions de mécanisme majeur ou de mécanisme mineur (Hiraku et al., 2007). Au cours des réactions majeures, des oxygènes singulets ($^1\text{O}_2$), molécules stables et très réactives, sont formées. Ces molécules vont interagir avec de nombreuses macromolécules dont l'ADN, où la formation de 8-oxodG est générée (Ravanat et al., 2001). Au cours des réactions mineures, on observe une formation d'anions superoxydes (O_2^-). Cet anion est très instable et va être dismuté en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 est capable de produire des dommages à l'ADN seulement en présence d'ions métalliques (Thiele, 2001). De plus par réaction de Fenton, l' H_2O_2 est transformé en radical hydroxyl ($^{\bullet}\text{OH}$), pouvant lui aussi induire des dommages à l'ADN. Notons que les ROS peuvent également interagir avec des protéines et des lipides, et provoquer des dommages à ces molécules (Pattison and Davies, 2006).

3. Les mécanismes de réparations de l'ADN

Les dommages occasionnés par les UV mènent à un arrêt transitoire ou permanent du cycle cellulaire ou à l'induction de l'apoptose suivant le type de dommage et son intensité (Vermeij et al., 2014). Afin de réparer ces dommages, la cellule a mis en place de nombreuses stratégies afin d'éviter les effets mutagènes des UV. À côté des différentes voies de réparation de l'ADN (Figure I.13), des molécules antioxydantes permettent une protection contre les ROS et le stress oxydatif avant que ceux-ci n'induisent des dommages.

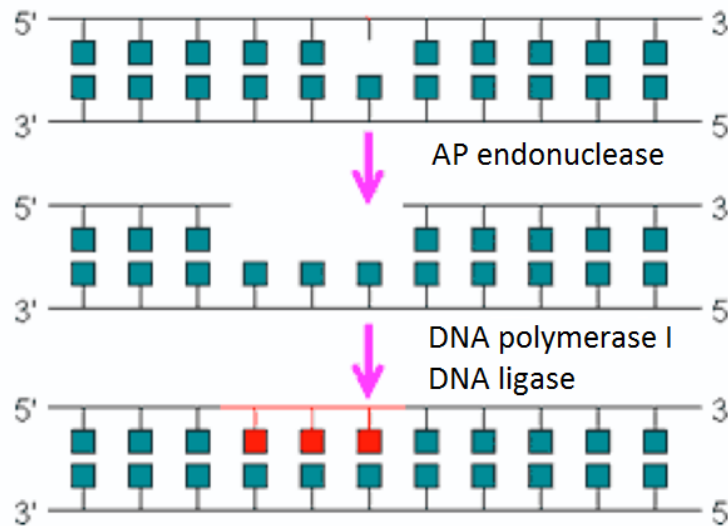


Figure I.14 : Représentation schématique de la réparation par le base excision repair (BER). Le dommage est reconnu par des enzymes ADN glycosylases, excisant les bases endommagées. Le site a-purique ou a-pyrimidique est reconnu par des AP endo- et exonucléases, clivant le squelette sucre-phosphate. Une ADN polymérase resynthétise les bases manquantes. Finalement, les extrémités sont liées entre elles par une ADN ligase (Source : Mutations, Deletions, Duplications & Repair, http://virtuallaboratory.colorado.edu/Biofundamentals-web/lectureNotes-Revision/Topic3-4_Mutation.htm).

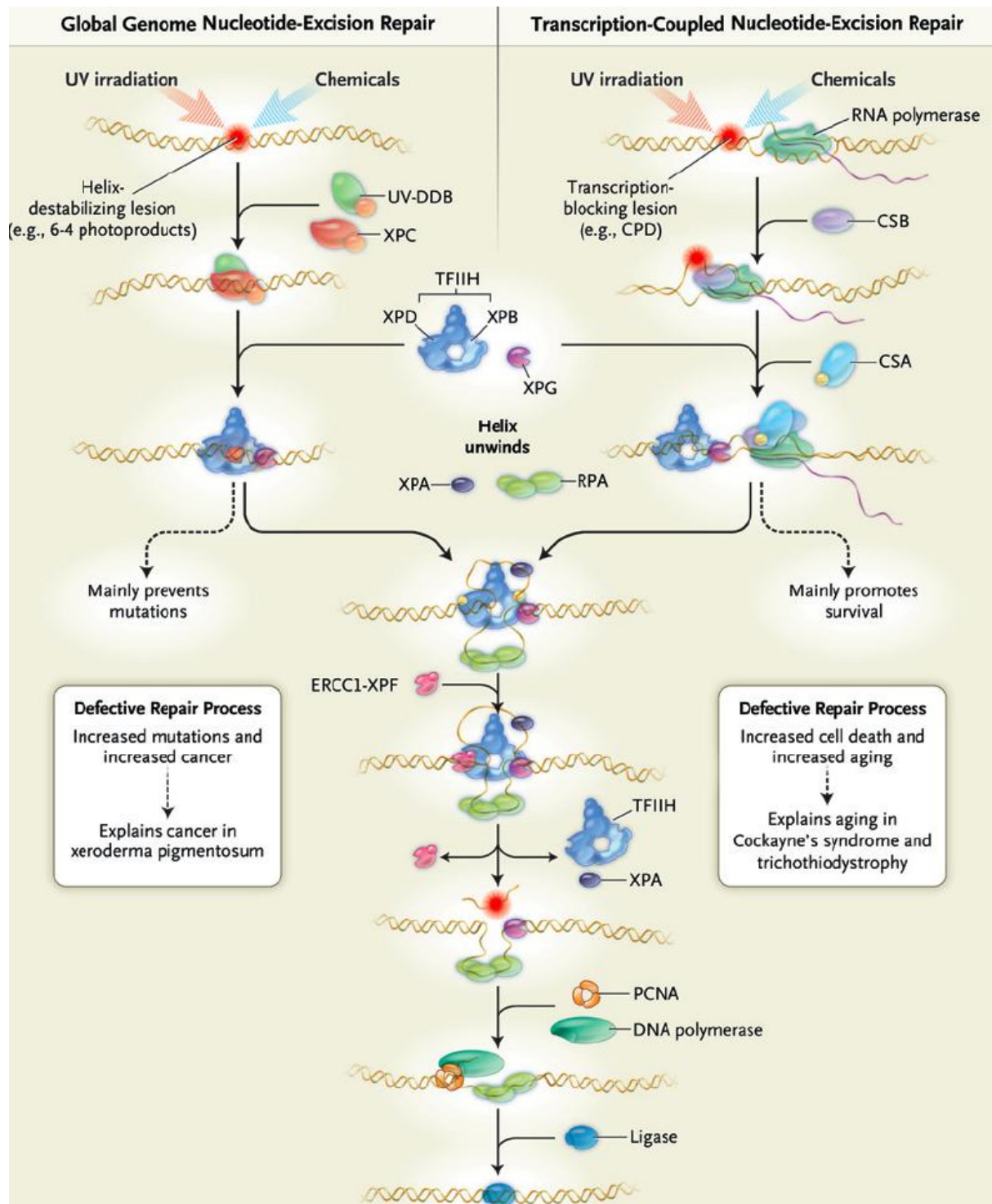


Figure I.15 : Représentation schématique de la réparation par le nucléotide excision repair (NER). Les mécanismes de réparation se font via deux voies. Le global genome repair (GGR, réparant des lésions dans tout le génome) et le transcription coupled repair (TCR, réparant des lésions bloquant la transcription) (Hoeijmakers, 2009).

a. Le base excision repair (BER)

Le base excision repair (BER) permet, comme son nom l'indique, d'exciser et de réparer des modifications au niveau des bases de l'ADN (Figure I.14). Parmi les différentes modifications telles que l'oxydation, l'alkylation et la déamination, l'oxydation de la guanine en 8-oxodG est la plus fréquente (Dizdaroglu et al., 2002). Dans un premier temps, le dommage est reconnu par des enzymes ADN glycosylases. Celles-ci vont exciser les bases endommagées et produire un site a-purique ou a-pyrimidique (AP). Ce site AP est ensuite reconnu par des AP endonucléases. Ces endonucléases clivent le squelette sucre-phosphate générant ainsi dans le brin d'ADN les extrémités désoxyribose-5'-phosphate et 3'OH. L'extrémité désoxyribose-5'-phosphate est ensuite clivée par une AP exonucléase permettant à une ADN polymérase de resynthétiser les bases manquantes. Finalement, les extrémités sont liées entre elles par une ADN ligase (Wilson and Bohr, 2007, Jeppesen et al., 2011).

b. Le nucleotide excision repair (NER)

Le nucleotide excision repair (NER) permet la réparation de lésions induisant une distorsion dans la chaîne de l'ADN (Gillet and Scharer, 2006) (Figure I.15). Le processus de NER est complexe. Il inclut plus de 30 protéines et se fait en 5 étapes. Dans un premier temps, la lésion d'ADN est reconnue, ensuite le brin est incisé de part et d'autre de la lésion. Au cours de la troisième phase, la lésion est excisée du brin. Ensuite, un nouveau brin est synthétisé afin de remplacer la partie manquante. Finalement, le nouveau brin est lié au brin d'ADN initial (Aboussekhra and Wood, 1995).

Il existe deux voies de réparation de NER différentes. Le global genome repair (GGR) ainsi que le transcription coupled repair (TCR). Ces deux voies se différencient entre elles uniquement par l'étape de reconnaissance des dommages, étant donné qu'elles utilisent les mêmes machineries de réparation (Aboussekhra and Wood, 1995).

Le GGR est responsable de l'élimination des distorsions tout au long du génome, de manière indépendante du cycle cellulaire.

Le TCR, quant à lui, est initié lorsqu'une lésion au sein d'un gène activé induit un blocage de la progression de l'ARN polymérase.

c. La réparation des cassures double brin de l'ADN

Les cassures doubles brin (double strand break ou DSB) sont des lésions qui sont induites lorsque des dommages à l'ADN empêchent la réplication et la transcription de celui-ci. En effet, des dommages induits par le stress oxydatif, par l'exposition à des agents chimiques ou aux rayons UV, bloquent la progression de la fourche répllicative (Limoli et al., 2002). Cet arrêt mène à un effondrement de la fourche répllicative ainsi qu'à la formation des cassures double brin (Degraasi et al., 2004). Ces cassures sont généralement réparées par recombinaison homologue (RH) ou par jonction d'extrémités non homologues (non-homologues end joining ou NHEJ) (Vermeij et al., 2014).

Le mécanisme de **recombinaison homologue** permet la réparation des cassures double brin au sein de cellules prolifératives, lors des phases S et G2 du cycle cellulaire. En effet, ce mécanisme se base sur la présence du brin chromatide sœur comme modèle afin de resynthétiser le brin manquant (Dronkert et al., 2000).

La réparation par **jonction d'extrémités non homologues** permet une réparation des cassures double brin de manière indépendante du cycle cellulaire étant donné qu'il ne nécessite pas la présence du brin chromatide sœur. En effet, le mécanisme se fait en plusieurs étapes durant

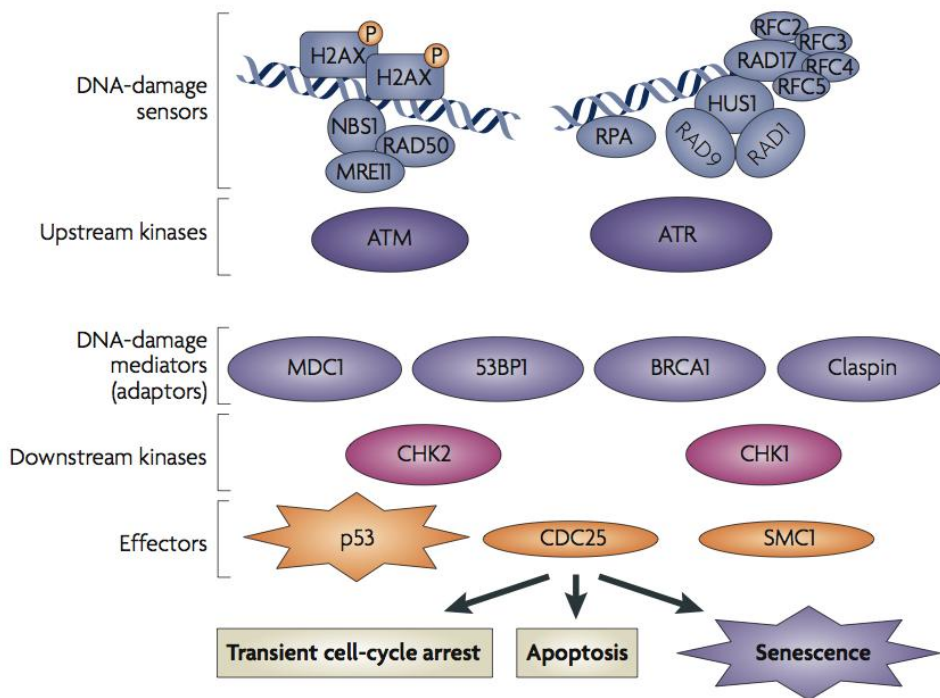


Figure I.16 : Représentation schématique de la réparation par la voie des réparations des dommages à l'ADN (DNA damage repair ou DDR). La voie de DDR transmet le signal de dommage au sein de la cellule afin d'induire un arrêt de la progression du cycle cellulaire. Le tout mène à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose ou encore à la sénescence, si le signal persiste (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

lesquelles deux extrémités d'ADN, se trouvant à proximité, sont liées entre elles (Iyama and Wilson, 2013).

Cependant, lorsque la réparation est incomplète, les cassures persistent et induisent un stress au sein de la cellule. Ces cassures sont détectées et activent la voie de réparation des dommages à l'ADN (Iyama and Wilson, 2013).

La voie de **réparation des dommages à l'ADN** (DNA damage repair ou DDR) (Figure I.16) transmet le signal de dommage au sein de la cellule afin d'induire un arrêt de la progression du cycle cellulaire (von Zglinicki et al., 2005). Ceci a comme but de permettre une réparation du dommage avant la poursuite du cycle, empêchant la croissance de cellules présentant des lésions importantes au niveau de l'ADN. Dans un premier temps, les cassures double brin sont reconnues par le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) et mènent à l'activation de la kinase ataxia-telangiectasia (ATM). Les cassures simple brin sont reconnues par la protéine de réplication A (RPA) et mènent à l'activation, en amont, de la kinase ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR). Celle-ci va interagir avec le complexe 9-1-1 (comprenant RAD9, RAD1 and HUS1). Ensuite, de nombreuses protéines adaptatrices, telles que p53 Binding Protein (53BP1), mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1), breast cancer type-1 susceptibility (BRCA1) ou encore Clapsin propagent le signal et activent, en aval, d'autres kinases telles que les checkpoint kinases -1 (CHK1) et -2 (CHK2). Ces dernières transmettent le signal de dommage à des protéines effectrices comme le facteur de transcription, p53 ou encore Cdc25 et SMC1. La phosphorylation de p53 active une kinase dépendante des cyclines (cyclin dependent kinase ou CDKI) p21^{WAF-1}. Le tout mène à l'arrêt du cycle cellulaire ou à la sénescence dans le cas d'un signal persistant. De plus, la phosphorylation de l'histone H2AX facilite l'assemblage de facteurs de points de contrôle et la réparation de l'ADN, indispensable à la survie de la cellule (Sulli et al., 2012, Zgheib et al., 2005).

La voie de réparation de dommages à l'ADN (DDR) semble être liée à l'induction de la sénescence au sein des cellules (Kuilman et al., 2010). En effet, il a été suggéré que le phénotype sénescence pourrait être maintenu par une activité constante des kinases telles que ATM, ATR, CHK1 ou CHK2 (von Zglinicki et al., 2005). Ceci montre que la voie de la DDR joue un rôle intracellulaire, qui protège l'information génétique et qui aide à assurer la suppression de cellules endommagées au sein des tissus. Le but serait d'empêcher une transformation néoplasique de ces cellules (Malaquin et al., 2015). De plus l'activation persistante de la DDR influence, de manière paracrine, les cellules et le microenvironnement avoisinant en envoyant des « signaux d'alarme ». Ces signaux mèneraient à un comportement associé à la DDR dans les cellules voisines, permettant une adaptation de celles-ci au stress apparent (Malaquin et al., 2015). Il a été observé que les cellules endommagées peuvent envoyer des signaux par l'intermédiaire de contacts directs entre deux cellules (passages de ROS par des jonctions communicantes) (Azzam et al., 2001). Des signaux peuvent également influencer les cellules voisines de manière paracrine. Ce phénomène est basé sur le fait que l'activité persistante de la DDR induit un phénotype sécrétoire (SASP) des cellules endommagées et sénescence (cfr IV.4.g) (Acosta and Gil, 2012). Bien que l'activation de la DDR semble être impliquée dans l'induction de ce phénotype sécrétoire (pour certains facteurs, dont IL-6 et IL-8), elle ne semble cependant pas suffisante (Rodier et al., 2009).

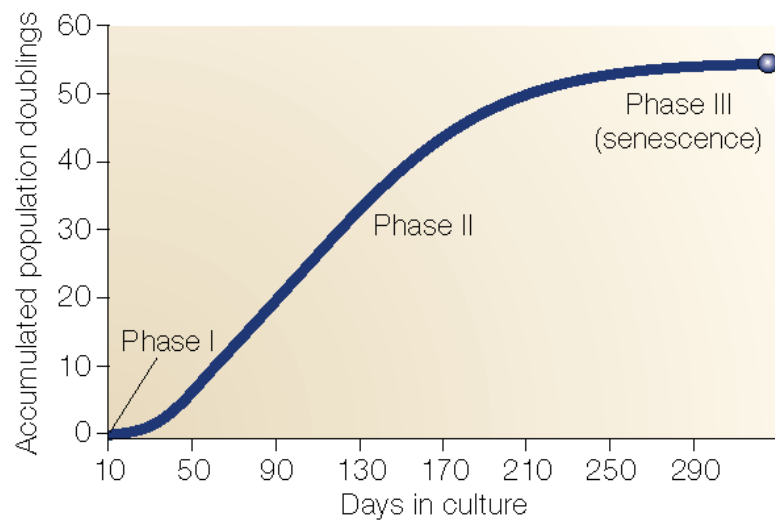


Figure I.17 : Les phases des cultures cellulaires selon Hayflick. Au court de la phase I, les cellules sont mises en culture et se divisent peu. Elles doivent tout d'abord s'adapter à leur environnement de culture. Pendant la phase II, les cellules se divisent de manière exponentielle. En phase III, les cellules ralentissent leurs divisions cellulaires jusqu'à arrêter la prolifération de manière définitive. Cependant, elles restent métaboliquement actives pour plusieurs mois avant de mourir par dégénérescence (Shay and Wright, 2000).

d. Les mécanismes antioxydants

Les cellules possèdent des mécanismes antioxydants protégeant des effets néfastes des ROS (Sies, 1997). Le but est de maintenir une homéostasie de la production des ROS et d'éviter que ceux-ci, en concentration élevée, n'entraînent des effets délétères (Rhee, 2006). Ces mécanismes antioxydants font intervenir diverses enzymes.

Parmi celles-ci, la glutathion oxydase est capable d'éliminer des oxygènes singulets ou les peroxydes d'hydrogène par réaction avec le groupe thiol d'une molécule de glutathion (Tyrrell and Pidoux, 1986). La superoxyde dismutase permet la transformation d'anions superoxydes en peroxydes d'hydrogène. Ces derniers sont ensuite transformés par la catalase en eau (Sasaki et al., 1997).

L'expression de ces enzymes est contrôlée par des éléments régulateurs (antioxidant response element (ARE)), localisés en amont de leur promoteur. En condition de stress oxydatif, la transcription de ces gènes est initiée par des facteurs de transcription tels que par exemple Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2). Il s'agit d'un facteur de transcription appartenant à la famille des basic leucine zipper (Moi et al., 1994).

En condition normale des cellules, Nrf2 est tenu à un niveau basal et est séquestré dans le cytoplasme des cellules. Ceci se fait par l'intermédiaire de Keap1, une protéine adaptatrice qui facilite l'ubiquitination par la culline 3 (Itoh et al., 1999). En revanche, lors d'un stress oxydatif, la séquestration de Nrf2 par Keap1 et l'ubiquitination par la culline 3 est perturbée. Nrf2 peut alors transloquer dans le noyau où il forme un hétéro-dimère avec la petite protéine Maf. Le complexe se lie alors aux régions ARE, initiant ainsi la transcription d'enzymes antioxydantes (Hayes et al., 2010).

Certaines molécules de source exogène présentent également des capacités anti-oxydantes. C'est le cas de la vitamine C ou acide ascorbique, de la vitamine E ou α -tocopherol, ainsi que les caroténoïdes, les polyphénols contenus dans les thés verts et noirs (Wang et al., 1994) ou encore dans l'huile d'olive (Visioli et al., 1998).

IV. Le vieillissement *in vitro*

1. La sénescence répllicative

C'est en 1961 que Leonard Hayflick et Paul Moorhead découvrent la sénescence cellulaire. En cultivant des fibroblastes humains normaux, ils observent que ceux-ci ont une capacité limitée à se diviser. Cette limite de prolifération est aussi connue sous le nom de « limite de Hayflick » (Figure I.17). Elle est caractérisée par un arrêt définitif de prolifération après un certain nombre de doublements cumulatifs de population, variable en fonction du type cellulaire (Hayflick and Moorhead, 1961). Ce phénomène d'arrêt de division a été nommé « sénescence répllicative ». Elle est liée au raccourcissement des télomères, structures protégeant les extrémités des chromosomes.

Hayflick et Moorhead montrent que la vie des cellules en culture peut être divisée en trois phases (Figure I.17): une phase de mise en culture (I), une phase de prolifération (II) et une phase d'arrêt de prolifération (sénescence) (III). Au cours de la phase I, les cellules sont mises en culture et se divisent peu. En effet, elles doivent tout d'abord s'adapter à leur environnement de culture. Pendant la phase II, les cellules se divisent de manière exponentielle. En phase III, les cellules ralentissent leurs divisions cellulaires jusqu'à un arrêt définitif de la prolifération. Cependant, elles peuvent rester métaboliquement actives plusieurs mois avant de mourir par dégénérescence (Hayflick and Moorhead, 1961).

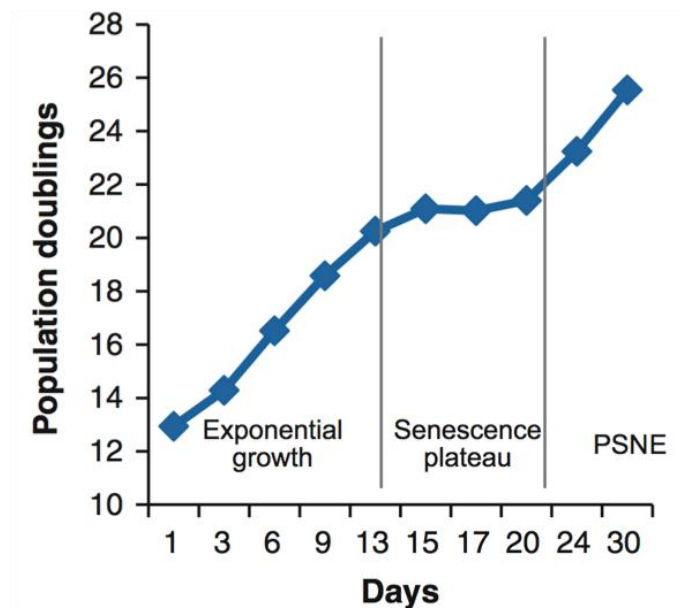


Figure I.18 : Courbe de prolifération et de dédoublement de population des kératinocytes. Dans un premier temps, les kératinocytes prolifèrent de manière exponentielle jusqu'à atteindre le stade de sénescence où un arrêt du cycle cellulaire est observé. Ensuite, certains kératinocytes réactivent leur processus de prolifération de manière spontanée donnant ainsi naissance à de l'émergence néoplasique post-sénescence (PSNE) (Deruy et al., 2014).

Bien que la sénescence répllicative ait été découverte dans des fibroblastes, elle est observée dans de nombreux autres types cellulaires, tels que les cellules endothéliales (Kurz et al., 2000) ou les kératinocytes (Gosselin et al., 2009). Cependant, les kératinocytes présentent une particularité, car, après avoir atteint le stade de sénescence, certains réactivent leurs processus de prolifération de manière spontanée. Cela entraîne une émergence néoplasique post-sénescence (PSNE) (Figures IV.18). Il a été observé, que les kératinocytes sénescents diminueraient partiellement le processus de macroautophagie, ce qui leur permettrait d'échapper à la mort cellulaire et ce qui entraîne l'émergence (Deruy et al., 2014).

Bien que la sénescence soit liée au raccourcissement des télomères, elle peut être induite de manière prématurée - bien avant que la longueur des télomères ne devienne critique - par l'expression d'oncogènes ou par l'exposition des cellules à différents stress (Wei et al., 1999).

2. La sénescence induite par les oncogènes (OIS)

Un oncogène est une version mutée d'un proto-oncogène menant ainsi à une prolifération excessive et incontrôlée des cellules (Campbell, 2007). Comme mécanismes de défense, les cellules normales répondent à certains oncogènes par l'entrée en sénescence (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Ce phénomène, nommé sénescence induite par les oncogènes (oncogene induced senescence ou OIS), a été observé pour la première fois en 1997 par l'équipe de Serrano et al., via la surexpression d'une version mutée du proto-oncogène *H-ras* (*H-rasV12*) dans des fibroblastes normaux humains et de rongeurs (Serrano et al., 1997). *H-ras* code pour une petite GTPase, qui possède un rôle de transducteur de signaux mitogènes au sein de la cellule (via les récepteurs tyrosine-kinase) (Maya-Mendoza et al., 2015). Ainsi, lorsque RAS est muté, la version oncogénique transmet des signaux mitotiques incontrôlés. Ceux-ci mènent, avec une surexpression de c-Myc et une suppression de p53, p16^{INK-4A}, Cdc25A ou les cyclines de type D, à une prolifération anarchique des cellules (Ruley, 1990). Cependant, Serrano et al. montrent que l'expression d'une forme oncogénique (*H-rasV12*) induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. De plus, une augmentation abondante de la quantité de p53 et p16^{INK-4A}, inhibant le cycle cellulaire, est observée (Serrano et al., 1997). L'induction de la sénescence par les oncogènes est indépendante du raccourcissement des télomères. En effet, une surexpression de la sous-unité hTERT de la polymérase dans des fibroblastes humains normaux, n'empêche pas l'induction de la sénescence par l'oncogène *H-rasV12* (Wei et al., 1999). Depuis, l'induction de la sénescence a été observée par l'expression d'autres formes oncogéniques, membres de la voie de RAS, tels que RAF, MEK, MOS et BRAF (Dimri et al., 2000, Lin et al., 1998) ou par la surexpression de protéines pro-prolifératives comme E2F (Dimri et al., 2000).

3. La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)

La sénescence peut également être induite de manière prématurée, bien avant que le raccourcissement des télomères devienne trop critique, en soumettant des cellules (fibroblastes, cellules endothéliales, mélanocytes, kératinocytes) à différents types de stress à des doses subléthales (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Plusieurs protocoles menant à la sénescence induite prématurément par des stress (SIPS), ont été établis à partir d'agents stressants induisant un stress ou des dommages à l'ADN.

Parmi les protocoles SIPS, on peut citer une exposition de manière prolongée à une hyperoxie (concentration de 40% en O₂ comparé au 21% atmosphérique) (von Zglinicki et al., 2005) ou des expositions répétées au *ter*-buyhlhydroperoxyde (*t*-BHP) (Toussaint et al., 1992), à la

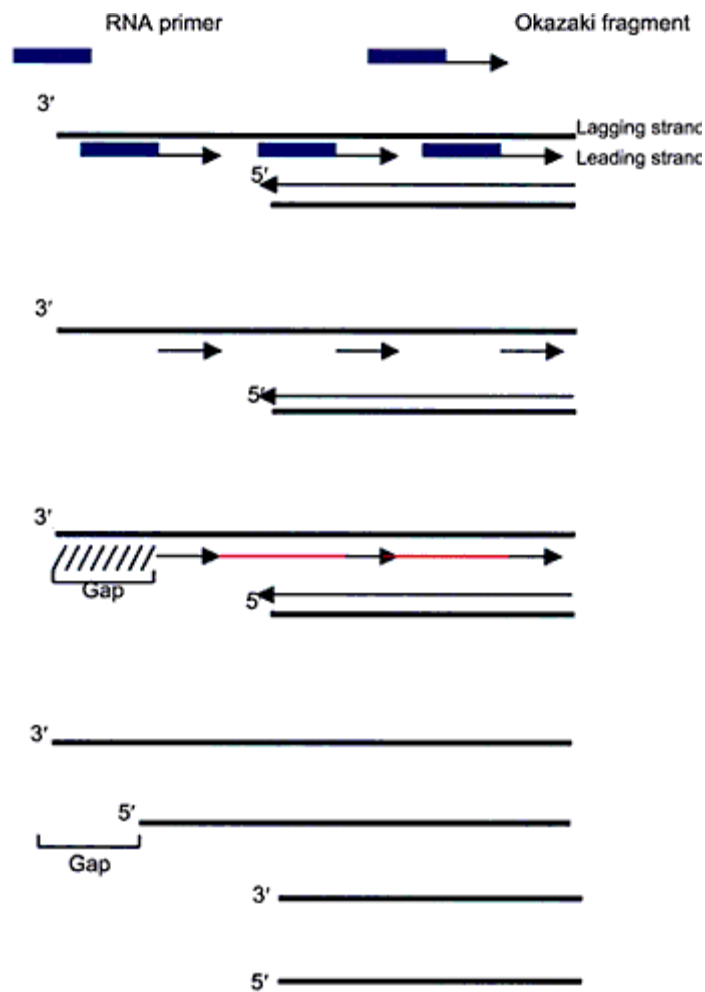


Figure I.19 : Représentation schématique du raccourcissement des télomères lors de la réplication de l'ADN. Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase synthétise des nouveaux brins dans le sens 5' – 3' donnant naissance à un brin continu et un brin discontinu. Ce dernier est composé de plusieurs fragments d'ADN nommés fragments d'Okazaki au début desquels se retrouve une amorce d'ARN. A la fin de la réplication, les amorces d'ARN sont dégradées, remplacées par de l'ADN et liés entre eux, à l'exception de la première amorce. Celle-ci ne peut pas être remplacée par de l'ADN étant donné qu'il manque une extrémité 3' permettant la synthèse d'ADN. C'est ainsi qu'après chaque réplication les télomères se raccourcissent de 50 à 150 pb (Naasani, 2000).

mitomycin c (Rodemann, 1989) au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Chen et al., 2000), ou aux rayons UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

L'induction de la SIPS semble indépendante du raccourcissement des télomères. En effet, les travaux de Wei et *al.* montrent qu'en exprimant la sous-unité hTERT de la télomérase au sein des fibroblastes, les biomarqueurs de la sénescence restent observés au sein des cellules (Wei et al., 1999).

4. Les biomarqueurs de la sénescence

Les cellules sénescents, aussi bien en sénescence répliative qu'en OIS ou SIPS, sont caractérisées par des biomarqueurs communs. Certains, tels que l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal), permettent de différencier, au sein d'une population hétérogène, les cellules sénescents des cellules en prolifération ou en quiescence (Dimri et al., 1995, Lawless et al., 2010). De plus, certains biomarqueurs, tels que la SA- β gal (Dimri et al., 1995), la surexpression de p16^{INK-4A} (Martin and Baxter, 1991) ou encore la délétion « commune » de l'ADN mitochondrial (Baxter, 2001) sont également observés *in vivo*.

a. Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont des séquences répétées (5' TTAGGG 3') d'une longueur de 10 à 15 kb. Ils sont non codants et se retrouvent aux extrémités des chromosomes. En interagissant avec de nombreuses protéines, ils forment une structure tridimensionnelle nommée le télosome (Liu et al., 2004). Ce dernier maintient l'intégrité du génome en empêchant des réarrangements chromosomiques ainsi que des fusions de chromosomes par le processus de réparation de l'ADN. En plus, il protège l'ADN contre la dégradation par des exonucléases (Xin et al., 2008).

Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase synthétise des nouveaux brins dans le sens 5' - 3', donnant naissance à un brin continu et un brin discontinu. Ce dernier est composé de plusieurs fragments d'ADN nommés fragments d'Okazaki, au début desquels se retrouve une amorce d'ARN. A la fin de la réplication, les amorces d'ARN sont dégradées et remplacées par de l'ADN. Finalement les fragments d'ADN sont liés entre eux. Cependant la première amorce ne peut pas être remplacée par de l'ADN étant donné qu'il manque une extrémité 3' permettant la synthèse d'ADN. C'est ainsi qu'après chaque réplication les télomères se raccourcissent de 50 à 150 pb (Figure I.19) (Campbell, 2007). Lorsque les télomères atteignent une longueur critique, celle-ci est perçue par la cellule comme un dommage à l'ADN, et plus particulièrement comme une cassure double brin, ce qui entraîne l'activation de la DDR (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Le phénomène de raccourcissement des télomères est observé dans la plupart des cellules eucaryotes à l'exception des cellules germinales, des cellules souches, et lors du développement embryonnaire. Dans ce cas-ci, il est nécessaire de permettre une prolifération illimitée et donc d'éviter le raccourcissement des télomères (Campbell, 2007). Pour ce faire, une enzyme capable de rallonger les télomères est exprimée. Il s'agit de la télomérase. Celle-ci est une ribonucléoprotéine composée d'une sous-unité à activité catalytique, la télomérase reverse transcriptase ou TERT, et une sous-unité d'ARN servant d'amorce, la télomérase RNA component ou TERC (Vinagre et al., 2014). Il a été observé, que dans 90% des cancers, la sous-unité TERT est réactivée permettant une prolifération excessive des cellules

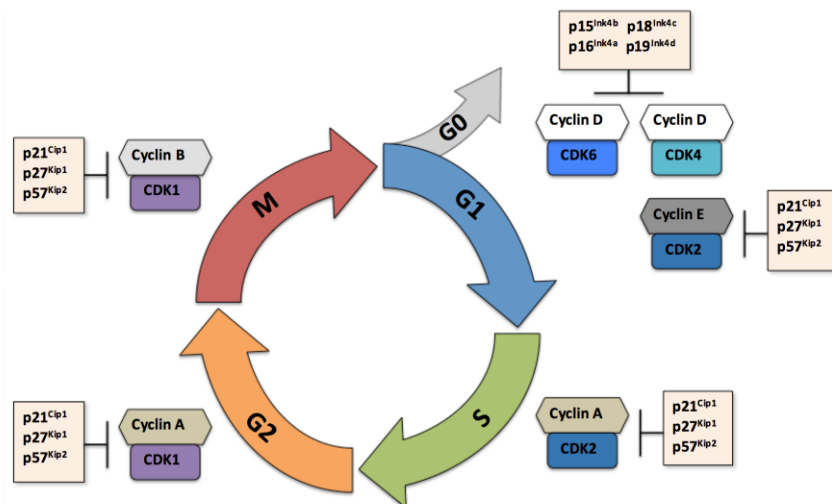
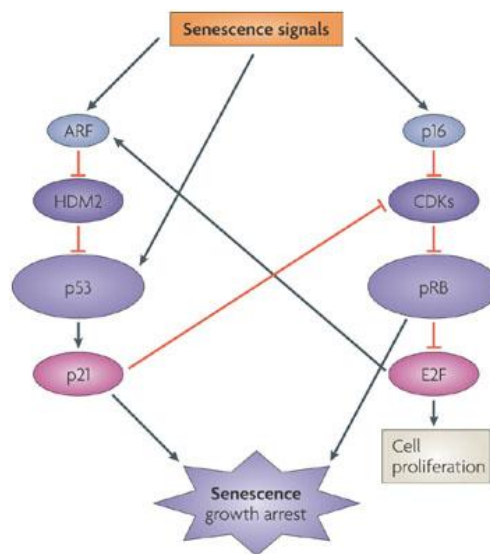


Figure I.20 : Représentation schématique du cycle cellulaire régulé par les différents complexes CDK-cyclines. La régulation du passage d'une phase à une autre est à chaque fois contrôlée par des complexes spécifiques de CDK/cycline pour ce point de contrôle. La phase G1 est contrôlée par le complexe CDK4/cycline D et CDK6/cycline D. La phase S est contrôlée par le complexe CDK2/cycline A. La phase G2 est contrôlée par le complexe CDK1/cycline A. La mitose se fait sous contrôle de CDK1/cycline B.

(Source : Cell Cycle and cancer, Cubocube, <http://www.cubocube.com/dashboard.php?a=1642&b=1691&c=1>)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure I.21 : Représentation schématique de l'arrêt du cycle cellulaire par les voies p53/p21 et p16^{INK4A}/pRB. Les signaux, tels que les dommages à l'ADN ou le dysfonctionnement des télomères, activent la protéine alternate reading frame protein (ARF). Celle-ci va dégrader la E3 ubiquitine-protein ligase HDM2, une protéine qui a comme rôle de séquestrer p53 en temps normal, aboutissant ainsi à l'activation de p53. Ce facteur de transcription, active p21^{WAF-1}, inhibant les complexes CDK4/cyclineD ou CDK6/cyclineD, qui initialement phosphorylent la protéine de rétinoblastome (pRB). La forme hypophosphorylée de pRB va ensuite se lier à l'E2F et inactiver ce facteur de transcription nécessaire à la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. L'activation de la voie p16^{INK4A}/pRB a souvent lieu dans un second temps. p16^{INK4A} est une CDKI pouvant également inhiber les complexes CDK4/cyclineD et CDK6/cyclineD, menant ainsi à l'hypophosphorylation de la protéine de rétinoblastome et une inactivation du facteur de transcription E2F (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

cancéreuses. Cette activation pourrait être induite par l'apparition de mutation dans le promoteur du gène *TERT* (Kyo et al., 2008).

b. L'arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en plusieurs phases : G1, S, G2 et M (Figure I.20) (Viallard et al., 2001). En phase G1, les cellules croissent jusqu'à atteindre leur taille finale et se préparent à la réplication de l'ADN. Durant la phase S (synthèse) a lieu la réplication de l'ADN, ainsi le matériel génétique est doublé. Ensuite, les cellules se préparent à la division cellulaire durant la phase G2. C'est durant la phase M (mitose) que les cellules se divisent pour donner naissance à deux cellules filles. Ces dernières commencent un nouveau cycle cellulaire avant de se diviser également. A côté des différentes phases du cycle cellulaire, les cellules peuvent également se trouver en phase G0, où elles ont temporairement arrêté de proliférer. On dit qu'elles sont en quiescence. Pour passer d'une phase à une autre, les cellules doivent passer par des points de contrôle (Viallard et al., 2001).

La progression au sein du cycle est régulée par différents facteurs : les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK). Celles-ci s'associent entre elles pour former des complexes hétérodimériques régulant la progression dans le cycle cellulaire (Hochegger et al., 2008). La régulation du passage d'une phase à une autre est contrôlée par des complexes cyclines-CDK différents et spécifiques pour ce point de contrôle (Figure IV.20) (Hochegger et al., 2008).

Chez la plupart des cellules sénescents, on observe un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Deux voies indépendantes maintiennent cet arrêt de prolifération : la voie p53/ p21^{WAF-1} et celle de p16^{INK4A}/pRB (Figure I.21). p53 et pRB sont des facteurs de transcription alors que p21^{WAF-1} et p16^{INK4A} sont deux inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDKI). Ces derniers sont donc de forts régulateurs négatifs du cycle cellulaire (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Les signaux de sénescence, tels que les dommages à l'ADN ou le dysfonctionnement des télomères, activent la protéine « alternate reading frame protein » (ARF). Celle-ci va dégrader la protéine E3 ubiquitine-protein ligase HDM2. Cette dernière séquestre p53 en temps normal. La dégradation de l'E3 ubiquitine-protein ligase HDM2 par l'activation de ARF, aboutit finalement à une activation de p53. Ce facteur de transcription, aussi nommé « gardien du génome », active la CDKI p21^{WAF-1} qui va par la suite inhiber les complexes CDK4/cyclineD ou CDK6/cyclineD. Ces derniers ne peuvent plus phosphoryler la protéine de rétinoblastome (pRB) qui se trouve ainsi sous forme hypophosphorylée. La protéine pRB hypophosphorylée va lier et inactiver E2F, un facteur de transcription nécessaire à la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Sherr and McCormick, 2002).

L'activation de la voie p16^{INK4A}/pRB a souvent lieu en second temps (Takeuchi et al., 2010). Cependant, certains signaux de sénescence agissent de manière primaire par la voie de p16^{INK4A}/pRB. Ceci est observé dans des cellules épithéliales (Jacobs and de Lange, 2004). p16^{INK4A} est une CDKI pouvant également inhiber les complexes CDK4/cyclineD et CDK6/cyclineD. Ceci mène à l'hypophosphorylation de pRB et à l'inactivation du facteur de transcription E2F (Sherr and McCormick, 2002).

La sénescence peut également être établie de manière indépendante des voies p53/ p21^{WAF-1} et p16^{INK4A}/pRB. En effet, il a été observé que la réduction d'activité de la p300 histone acetyltransférase mène à la formation de foci d'hétérochromatines associées à la sénescence (senescence-associated heterochromatic foci ou SAHF) (Prieur et al., 2011). Ces SAHF empêchent la progression de la fourche de réplication et perturbent la réplication de l'ADN.

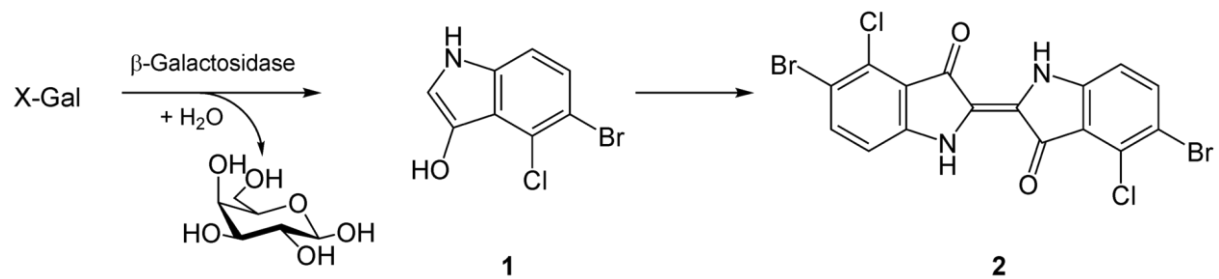


Figure I.22 : Représentation de la réaction de la β -galactosidase. L'hydrolyse du lien glycosidique du X-gal par l'enzyme β -galactosidase libère un noyau indolique. Ce dernier peut, par oxydation et dimérisation, aboutir à la formation d'un composé stable, non soluble et de couleur bleue. (Source : Novus Biologicals, LLC, beta Galactosidase IHC Kit 1 Kit, http://www.novusbio.com/beta-Galactosidase-Kit_NBP2-29546.html)

Ces stress de réplication, indépendants de dommages à l'ADN, induisent un arrêt stable du cycle cellulaire en phase S et mènent à la sénescence (Prieur et al., 2011).

c. Le changement de morphologie cellulaire

Les cellules sénescents présentent un changement de morphologie. Effectivement, elles deviennent plus grandes et plus aplaties. Certaines cellules sont même plurinucléées (Kuilman et al., 2010). Leur volume augmente, ce qui peut être expliqué par une augmentation de la masse lysosomale lors de la sénescence. En effet, des vacuoles autophagiques contenant des organelles et macromolécules non-dégradées s'accumulent au sein des cellules, ce qui entraîne une augmentation de la biogenèse de nouveaux lysosomes (Kurz et al., 2000).

Les kératinocytes normaux jeunes sont réguliers et présentent une petite forme polygonale (10-20 μm de diamètre). En vieillissant leur forme devient irrégulière et s'agrandit jusqu'à atteindre 50 μm de diamètre (Soroka et al., 2008).

d. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal)

L'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal) est un biomarqueur fréquemment utilisé, *in vitro* et *in vivo*, pour visualiser des cellules en sénescence (Debacq-Chainiaux et al., 2005, Dimri et al., 1995). La β -galactosidase, enzyme lysosomale, hydrolyse les liens osidiques des β -galactosides en monosaccharides. Son activité optimale à pH 4,0 est proche du pH lysosomal. En utilisant un composé chromogénique, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside ou X-gal (Figure I.22), son activité peut être visualisée. En effet, l'enzyme est capable d'hydrolyser ce substrat artificiel en libérant un noyau indolique qui formera un précipité bleu tant *in vitro* que *in vivo* (Dimri et al., 1995).

Lorsque les cellules deviennent sénescents, l'activité de la β -galactosidase peut être détectée à un pH suboptimal de 6,0. Cette activité est due d'une part à une surexpression de cette enzyme dans les cellules sénescents mais également à l'augmentation de la biogenèse des lysosomes (Kurz et al., 2000).

e. La délétion de l'ADN mitochondrial

Les mitochondries sont les organites qui fournissent l'énergie nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. De plus, elles constituent une source endogène de ROS (Kamenisch et al., 2007). Elles contiennent leur propre matériel génétique, nommé ADN mitochondrial ou ADN mt. Cette molécule génomique est circulaire, bicaténaire et code pour une partie des protéines de la chaîne respiratoire (Holt and Reyes, 2012). De nombreuses mutations et délétions s'accumulent dans l'ADN mt lors du vieillissement (Liu et al., 2015). Parmi ces délétions, une délétion de 4977pb, est le plus souvent observée, ainsi nommée « délétion commune » (Hsieh et al., 1994).

f. Les changements de l'expression génique associés à la sénescence

Une modification de l'expression génique est observée dans les cellules sénescents.

Parmi les gènes dont l'expression est diminuée, on retrouve les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire tels que « proliférative cell nuclear antigen » (PCNA) ou encore les cyclines A et B (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

De plus, une surexpression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'organisation du cytosquelette, dans le métabolisme ou encore dans l'inflammation est également observée. L'exemple le mieux connu est la surexpression de p16^{INK4A} et de

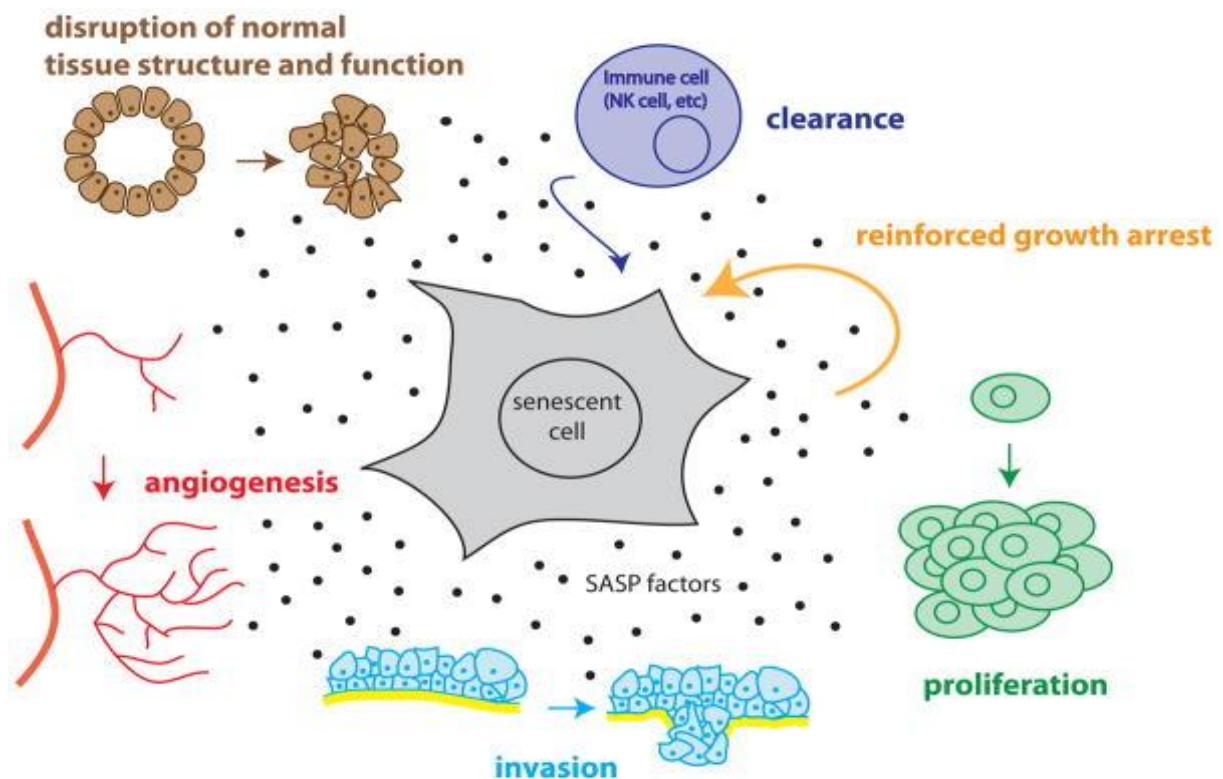


Figure I.23 : Effet du SASP (senescence associated secretory phenotype) sur les cellules sénescents et leur microenvironnement. Les facteurs sécrétés par le phénotype du SASP ont des effets autocrines sur les cellules sénescents en induisant la clairance des cellules sénescents, par les cellules "Natural Killer", et en renforçant l'arrêt du cycle cellulaire. De manière paracrine, les facteurs influencent l'augmentation de la prolifération et favorisent l'invasion de cellules néoplasiques et stimulent l'angiogénèse. De plus, le SASP mène à un déclin des structures et des fonctions des tissus avoisinants (Freund et al., 2010).

p21^{WAF-1}, deux CDKI aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire (Toussaint et al., 2000). Une augmentation de l'expression du gène de la fibronectine 1 (FN1), de l'apolipoprotéine J (ApoJ), des métalloprotéinases (MMP1, MMP3, MMP9) ou encore des cytokines (IL-6 et IL-8) peut aussi être citée. La FN1 est une protéine de la matrice extracellulaire, qui joue un rôle dans l'adhésion cellulaire, dans l'organisation du cytosquelette ou encore dans la médiation des signaux mitogènes extracellulaires (Toussaint et al., 2000). La surexpression de FN1 pourrait jouer un rôle dans les changements de morphologie observés chez des fibroblastes sénescents (Kumazaki et al., 1993). L'ApoJ, est une glycoprotéine exprimée dans de nombreux tissus où on lui associe une fonction de protéine chaperonne. Les métalloprotéinases sont des enzymes de la matrice extracellulaire capables de dégrader tous les composants de la MEC. Leur surexpression lors de la sénescence explique la réorganisation de la MEC (Linskens et al., 1995). Finalement, une surexpression de cytokines tels que IL-6 et IL-8, permet entre autre de renforcer le phénotype sénescents des cellules et l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, ces facteurs semblent agir de manière autocrine sur les cellules et coopérer avec les suppresseurs de tumeur p53 et pRB. Ces facteurs font partie du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (Coppe et al., 2010).

g. Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)

Le SASP est une propriété observée dans des cellules sénescents. En effet, il a été observé, qu'en sénescence, les cellules présentent des modifications dans la sécrétion de certains facteurs.

Parmi les facteurs du SASP, on retrouve des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 ou IL-8), des facteurs de croissance (IGF ou VEGF), des protéases (MMPs) ainsi que des composants de la matrice extracellulaire (FN1). Ces facteurs sécrétés agissent de manière auto- et paracrine et ont des effets bénéfiques ou néfastes sur les cellules voisines et le microenvironnement (Figure I.23) (van Deursen, 2014).

De manière autocrine, le renforcement de l'arrêt du cycle cellulaire peut être cité. En effet, les cytokines telles que IL-6 et IL-8 peuvent mener à l'activation des cascades de signalisation coopérant avec les voies p53/ p21^{WAF-1} et p16^{INK4A}/pRB (Freund et al., 2010).

En outre, les facteurs sécrétés peuvent agir de manière paracrine et induire des effets bénéfiques ou néfastes.

Parmi les effets bénéfiques, le SASP permet une cicatrisation optimale. Lors de la réparation d'une blessure, la fibrose au sein de la blessure est évitée. En effet, les protéases sécrétées permettent une dégradation du surplus de MEC limitant ainsi la fibrose (Jun and Lau, 2010). De plus, le SASP peut induire l'infiltration de lymphocytes « natural killer ». Ces derniers stimulent la destruction des cellules sénescents ayant pour but de les éliminer de l'environnement (Krizhanovsky et al., 2008).

Parmi les effets néfastes, l'activation du système immunitaire et la stimulation de la croissance de cellules précancéreuses et cancéreuses de l'entourage peuvent être citées (Campisi et al., 2011). En effet, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 ou IL-8) induit une inflammation chronique faible. Ceci mène à un déclin fonctionnel du système immunitaire adaptatif réduisant la réponse du système immunitaire avec l'âge (Freund et al., 2010). Pour la croissance de cellules précancéreuses et cancéreuses, certains facteurs induisent une transition épithélio - mésenchymateuse. Par exemple GRO, un facteur mitotique robuste pour des cellules épithéliales pré malignes, cause la croissance des tumeurs (Krtolica et al., 2011). Par ailleurs, VEGF favorise la vascularisation des tumeurs (Krtolica et al., 2001, Coppe et al., 2006). De plus, les protéases entraînent la destruction du tissu environnant par une perte de la fonction de soutien de celui-ci, (Liu and Hornsby, 2007). Il en résulte que la conversion en cellules malignes et l'invasion de celles-ci sont facilitées.

En ce qui concerne l'établissement du phénotype sécrétoire, il a été observé que l'activation de la DDR est nécessaire à l'apparition du SASP (Coppe et al., 2010). De plus, les cellules devenues sénescents par la voie p16^{INK4A}/pRB mais ne présentant pas de dommages à l'ADN n'expriment pas le SASP. Ceci montre l'importance de la voie pour l'établissement du SASP (Coppe et al., 2010).

Finalement, le SASP pourrait d'être impliqué dans différentes maladies liées à l'âge (Coppe et al., 2010). Par exemple, le SASP observé chez les astrocytes pourrait être à l'origine de la neurodégénération observée dans les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson (Bitto et al., 2010). Une inflammation chronique souvent liée à l'apparition du SASP est associée de manière générale à plusieurs maladies liées à l'âge tels que le cancer ou encore l'athérosclérose (Freund et al., 2010).

La sénescence apparaît comme une réponse cellulaire à de nombreux stress de sources endo- et exogène. Cependant, la sénescence est principalement étudiée sur des fibroblastes, type cellulaire historique, puisque Hayflick et Moorhead ont observé pour la première fois la sénescence au sein d'un fibroblaste. Elle est donc peu étudiée sur d'autres types cellulaires comme les kératinocytes. Ceux-ci sont pourtant le principal constituant cellulaire de la peau, qui est soumise à des stress environnementaux tels que l'exposition aux rayons solaires dont font partie les rayons UVB.

Le but de ce mémoire est de caractériser la sénescence des kératinocytes normaux humains (KC). L'objectif principal sera d'investiguer les voies de signalisation impliquées dans l'apparition prématurée de la sénescence induite par les UVB (SIPS-UVB).

Dans une première partie, la présence de différents biomarqueurs de la sénescence seront étudiés dans deux modèles de sénescence: la sénescence réplication (SR) et la sénescence induite par les stress UVB (SIPS-UVB).

Les biomarqueurs étudiés sont le changement de morphologie cellulaire, l'augmentation du pourcentage des cellules positives à l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal), les changements d'expression de gènes associés à la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire.

Dans une seconde partie, les voies de signalisation pouvant être impliquées dans l'apparition du phénotype sénescence induit par les SIPS-UVB seront étudiées. Pour ce faire la détection à long terme des dommages à l'ADN et à l'activation de la voie DDR (DNA Damage Repair) sera investiguée. De plus nous nous intéresserons à la présence de radicaux libres et à l'activation de Nrf-2.

MATERIEL
&
METHODES

Tableau II.1 : Matériel nécessaire à l'extraction des kératinocytes humains normaux à partir de biopsies de peau

Nom	Firme, pays
Milieu Leibowitz L15 (500 ml) Mix antibiotiques et antimycotiques (5 ml) Gentamycine (1 ml)	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA
PBS stérile	Lonza, Suisse
Ethanol	Acros Organics, USA
Dispase II Péniciline - streptomycine 1%	Roche Applied Science, Suisse Gibco, USA
Trypsine + 0,05% EDTA	Gibco, USA
PBS + 10% sérum <ul style="list-style-type: none"> - PBS stérile - Sérum de bovin foetal 	Lonza, Suisse Gibco, USA
Tamis cellulaire (porosité de 70 µm)	Greiner Bio-One, Autriche
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne
Milieu de culture complet (500 ml) <ul style="list-style-type: none"> - keratinocytes serum – free medium (K-SFM) - facteur de croissance épidermique recombinant humain (2,5 µg/500 ml) - extrait pituitaire bovin (25 mg/500 ml) 	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA
Boîtes de cultures T75	Greiner Bio One, Autriche

I. Culture cellulaire

Le type cellulaire utilisé durant ce mémoire est le kératinocyte humain normal (NHK), isolé à partir de prépuce de donneurs jeunes (âgés de 1 à 6 ans). Les biopsies proviennent de la clinique Saint Luc de Bouge, et la procédure d'isolation des NHKs est approuvée par le comité éthique de la clinique Saint Luc de Bouge.

1. Extraction des kératinocytes humains normaux à partir de biopsies de peau

a. Matériel

Tableau II.1

b. Méthode

Les biopsies, conservées dans du milieu Leibowitz L15 agrémenté d'antibiotiques et antimycotiques, sont débarrassées de leur tissu adipeux, et découpées en morceaux d'environ 5 mm². Ces morceaux sont ensuite rincés successivement dans trois baignoires : phosphate buffer saline (PBS) stérile - éthanol 70% - PBS stérile, puis incubés dans 7 ml de dispase II agrémentée de 1% de pénicilline-streptomycine.

Après une incubation overnight à 37°C, l'épiderme est séparé du derme, et incubé durant 20 minutes dans 10 ml de trypsine + 0,05% EDTA. Afin d'éviter une agglomération des épidermes, l'échantillon est agité toutes les 5 minutes d'incubation. L'action de la trypsine est ensuite inhibée par l'ajout de 10 ml de PBS + 10% de sérum de bovin fœtal (FBS). L'échantillon est homogénéisé par passages successifs dans une pipette de 5 ml, et passé sur un tamis cellulaire (porosité de 70 µm), préalablement placé sur un tube contenant 10 ml de PBS + 10% FBS. Le tamis est ensuite rincé avec 10 ml de PBS + 10% FBS. La suspension cellulaire est centrifugée 8 minutes à 1 200 rpm (centrifuge 5702, Eppendorf, Germany, Rotor : 5702/R). Le culot de cellules est resuspendu dans 15 ml de milieu de culture Kératinocyte-Serum Free Medium (K-SFM) complété avec de l'extrait pituitaire bovin (25 mg/ 500 ml) et du facteur de croissance épidermique recombinant humain (rEGF) (2,5 µg/ 500 ml). Les cellules sont maintenues en culture en boîtes T75 dans un incubateur à 37°C, à 95% d'humidité et à 5% de CO₂.

2. Culture cellulaire

a. Matériel

Tableau II.2

b. Méthode

Les NHKs sont repiqués lorsqu'ils atteignent 80% de confluence. L'ancien milieu de culture est décanté et 2 ml de trypsine + EDTA sont ajoutés par T75 (1 ml par T25). Les boîtes sont placées pendant quelques minutes dans une étuve sèche à 37°C. Lorsque toutes les cellules sont détachées, 10 ml de PBS + 10% FBS sont ajoutés afin d'inhiber l'action de la trypsine. La solution est transvasée dans un tube et centrifugée durant 8 minutes à 1 200 rpm. Ensuite, le surnageant est décanté et le culot de cellules est resuspendu dans du milieu K-SFM complet. En culture de routine, la suspension est distribuée dans deux nouvelles boîtes de culture T75 et du milieu est rajouté jusqu'à obtenir 15 ml par boîtes avant de placer celles-ci dans un

Tableau II.2 : Matériel nécessaire à la culture cellulaire

Nom	Firme, pays
Trypsine + 0,05% EDTA	Gibco, USA
PBS + 10% sérum <ul style="list-style-type: none"> - PBS stérile - Sérum de bovin foetal 	Lonza, Suisse Gibco, USA
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne
Milieu de culture complet (500 ml) <ul style="list-style-type: none"> - keratinocytes serum – free medium (K-SFM) - facteur de croissance épidermique recombinant humain (2,5 µg/500 ml) - extrait pituitaire bovin (25 mg/500ml) 	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA
Cellule de Neubauer	Marienfeld, Allemagne
Bleu trypan	Life Technologies, USA
Boite de culture T25 ou T75	Greiner Bio-One, Autriche
Plaque 6- puits, plaque 24- puits	Corning, USA
Couvre-objets	Assistent, Allemagne

Tableau II.3 : Matériel nécessaire à l'exposition des cellules aux UVB

Nom	Firme, pays
PBS stérile	Lonza, Suisse
Boite de Pétri	Greiner Bio-One, Autriche
Lampes Philips Narrowband TL20W/01 RS	Philips, Pays-Bas
Radiomètre	Vilber Lourmat, France
Capteur UVB	Vilber Lourmat, France
Milieu de culture complet (500 ml) <ul style="list-style-type: none"> - keratinocytes serum – free medium (K-SFM) - facteur de croissance épidermique recombinant humain (2,5 µg/500 ml) - extrait pituitaire bovin (25 mg/500 ml) 	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA

incubateur à 37°C, à 95% d'humidité et à 5% de CO₂. Ainsi, les cellules jeunes peuvent être cultivées jusqu'à atteindre la sénescence répllicative (aux environs du passage 12). Cependant, avant l'exposition aux UVB ou autres expériences, les cellules sontensemencées dans des boîtes de cultures (T75, T25, plaques 6-puits, plaques 24-puits, sur couvre-objets) et à une confluence adaptée à l'expérience.

II. Exposition des cellules aux UVB

a. Matériel

Tableau II.3

b. Méthode

Les cellules (en passage 6) sont repiquées, 72h avant les expositions, à la densité de 12 000 cellules/cm² pour les conditions UVB, et 8 500 cellules/cm² pour les conditions contrôles. Si les expositions aux UVB se font sur couvre-objets, les cellules sont repiquées la veille du stress à 40 000 cellules par couvre-objet (ou 30 000 par couvre-objet pour les conditions contrôles aux temps 48h et 72h après les stress UVB).

Avant d'exposer les cellules aux UVB, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées deux fois au PBS stérile. Durant les stress, les cellules sont maintenues dans du PBS stérile. 3 ml de PBS sont rajoutés par boîte T75 et 1 ml par T25. Pour les expositions aux UVB sur couvre-objets, ceux-ci sont placés dans une boîte de Petri contenant 5 ml de PBS. Les cellules sont placées dans un caisson contenant trois lampes Philips Narrowband TL 20W/01, installées à 30 cm au dessus des boîtes. Un radiomètre muni d'un capteur, également placé dans une boîte, permet de mesurer exactement l'énergie émise par les rayons UVB. A la fin de l'exposition, la fine couche de PBS est décantée et remplacée par du milieu de culture frais.

Pour la sénescence induite prématurément par des stress aux UVB (SIPS-UVB), les cellules sont exposées à 675 mJ/cm² trois fois par jour à intervalle de trois heures. Les cellules exposées à un seul stress fort, sont soumises à 1 000 mJ/cm² d'UVB. Les cellules contrôles sont également maintenues dans un volume identique de PBS, et conservées sous hotte durant les temps d'expositions.

III. Détection de l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence

La détection de l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal) est un biomarqueur de sénescence couramment utilisé. Le test se base sur la détection de l'activité de l'enzyme lysosomale β -galactosidase (β -gal) à un pH suboptimal de 6,0 alors que cette enzyme possède une activité optimale à pH 4,0. Due à une surexpression de son gène d'une part et à une augmentation de la biogenèse des lysosomes d'autre part, cette enzyme est surabondante chez les cellules sénescents.

Pour déterminer la proportion de cellules sénescents au sein d'une population, les cellules sont incubées avec une solution de coloration à pH 6,0 contenant du X-gal. L'enzyme β -gal est capable de cliver le X-gal en générant un composé de couleur bleue.

Tableau II.4 : Matériel nécessaire à la détection de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence

Nom	Firme, pays
PBS (1 l) - 9 g NaCl - 20 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - Eau milliQ	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Solution de fixation (1 l) - 2% formaldéhyde - 0,2% glutaraldéhyde - PBS	Carlo Erba Reagents, Italie Merck Millipore, USA
Solution de coloration (7 ml) - 1,4 ml tampon phosphate pH 6 - 350 μ l ferrocyanure de potassium 0,1 M - 350 μ l ferricyanure de potassium 0,1 M - 840 μ l NaCl 2,5 M - 14 μ l $MgCl_2$ 1 M - 3,7 ml eau milliQ - 7 mg X-gal - 350 μ l N,N-diméthylformamide	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Biosolve, Pays-Bas Sigma-Aldrich, USA
Méthanol	Acros Organics, USA

Tableau II.5 : Matériel nécessaire à la lyse cellulaire et l'extraction d'ARN

Nom	Firme, pays
Sodium dodécylsulfate 1% (à partir d'une solution 10%)	Merck Millipore, USA
PBS (1 l) - 9 g NaCl - 20 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - Eau milliQ	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Grattoir	TPP, Suisse
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Germany
Qiacube	Qiagen, Germany
Spectrophotomètre Nanodrop ND-1000	Qiagen, Germany

a. Matériel

Tableau II.4

b. Méthode

Lorsque les cellules arrivent en sénescence réplivative ou 48h après la dernière exposition aux UVB, elles sont repiquées dans du milieu de culture K-SFM complet à une densité de 12 000 cellules par puits dans une plaque 6 puits.

Le lendemain, le milieu est décanté et les cellules sont rincées deux fois au PBS. Elles sont ensuite fixées 5 minutes avec une solution de fixation, puis rincées deux fois au PBS. Les cellules sont finalement incubées avec la solution de coloration contenant le X-gal durant 16 heures en chambre chaude (37°C et 0,03% de CO₂) et à l'abri de la lumière comme décrit par Dirmi *et al.* (Dimri *et al.*, 1995).

Après incubation, la solution de coloration est décantée. Les cellules sont rincées deux fois au PBS et une fois au méthanol avant d'être séchées quelques minutes à l'air libre.

La proportion de cellules positives à la SA-βgal est déterminée par le rapport entre les cellules positives et les cellules totales, en comptant 400 cellules par puits et 3 puits par condition.

IV. Extraction d'ARN, rétro-transcription et PCR en temps réel

La PCR en temps réel (real-time polymerase chain reaction), permet l'étude de la variation d'expression génique entre différentes conditions expérimentales, en quantifiant l'abondance relative d'ARNm. Après isolation de l'ARN total, la rétro-transcription permet la synthèse d'ADNc à partir d'ARNm grâce à l'utilisation d'une polymérase ARN dépendante, et d'amorces polyT. Lors de la PCR, le SYBRGreen, un agent intercallant fluorescent, s'insinue dans les ADN double brin en cours de synthèse (ciblés grâce à des amorces spécifiques), permettant une future quantification de l'abondance des transcrits d'intérêt.

1. Lyse cellulaire et extraction d'ARN

a. Matériel

Tableau II.5

b. Méthode

Lorsque les cellules arrivent en sénescence réplivative ou aux différents temps après la dernière exposition aux UVB, les extractions d'ARN total sont réalisées à l'aide du RNeasy Mini Kit et du QIAcube de chez QIAgen. Les manipulations sont réalisées en conditions RNase-free (voir ci-dessous) et suivant les instructions du fabricant. Le programme utilisé dépend du nombre de cellules de départ. Ainsi, le programme RNeasy Mini Kit « large sample » + DNase digest est utilisé pour extraire l'ARN de cellules d'une boîte de culture T75 et le programme RNeasy Mini Kit « standard » + DNase digest lorsque l'extraction se fait à partir d'une T25. La dégradation de l'ARN, molécule non stable, par des enzymes telles que les RNases doit impérativement être écartée. Pour éviter la présence des RNases, une palliasse RNase-free est préparée en la nettoyant, ainsi que le matériel utilisé, avec une solution de sodium dodécylsulfate 1% (SDS).

Après cette étape de préparation, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées au PBS. Les cellules sont lysées avec 600 µl par T75 ou 350 µl par T25 de tampon d'extraction RLT. Les cellules sont détachées à l'aide d'un grattoir, et le lysat est récupéré dans un tube de récolte de 2 ml avant extraction par le QIAcube. La concentration et la qualité de l'extrait

Tableau II.6 : Matériel nécessaire à la rétro-transcription

Nom	Firme, pays
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Life Science, Suisse

Tableau II.7 : Matériel nécessaire à la PCR en temps réel

Nom	Firme, pays
Plaque 96 puits	Greiner Bio-One, Autriche
Eau milliQ	
SYBR Select Master Mix	Applied Biosystems, USA
Centrifugeuse	Thermo Scientific, USA
StepOne Plus	Applied Biosystems, USA
Logiciel « Thermal cycler software »	Applied Biosystems, USA

Tableau II.8 : Amorces utilisées lors de la PCR en temps réel

Gène	Abréviation	Amorce sense	Amorce anti-sense
Apolipoprotéine J	Apo J	GGA TGA AGG ACC AGT GTG ACA AG	CAG CGA CCT GGA GGG ATT C
Fibronectine	FN 1	TGT GGT TGC CTT GCA CGA T	GCT TGT GGG TGT GAC CTG AGT
Glyceraldéhyde-3-phosphate-dehydrogenase	GAPDH	ACC CAC TCC ACC TTT GAC	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA
Metalloprotéinase 9	MMP 9	CCTTCC TTA TCG CCG ACA AGT	ACC GAC GCG CCT GTG TAC
p16 ^{INK4a}	p16 ^{INK4a}	GCC CAA CGC ACC GAA TAG T	CGC TGA CAA TCA TCA TGA C
p21 ^{WAF-1}	p21 ^{WAF-1}	CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA	CCA GGA CTG CAG GCT TCC T
protéine ribosomal L13a	RPL 13a	GCC TAC AAG AAA GTT TGC CTA	TGA GCT GTT TCT TCT TCC GGT

d'ARN total sont déterminées par une lecture d'absorbance à 260 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop. L'ARN est stocké à -80°C.

2. Rétro-transcription

a. Matériel

Tableau II.6

b. Méthode

La transcription inverse est réalisée à l'aide du « Transcriptor first strand cDNA synthesis kit » selon les recommandations du fabricant. En conditions RNase-free, 2 µg d'ARN totaux sont engagés par réaction, dans un volume final de 12 µl atteint grâce à l'ajout d'eau « RNase-free ». Ensuite, 1 µl d'oligo dT est ajouté par échantillon et la réaction d'hybridation des amorces aux transcrits est réalisée par une incubation de 10 minutes à 65°C. Un mélange réactionnel contenant 2 µl de déoxynucléotides, 0,5 µl d'enzyme reverse transcriptase, 0,5 µl d'anti-RNases et 4 µl de tampon de reverse transcription 5x est ensuite ajouté par échantillon, suivi d'une incubation de 30 minutes à 55°C permettant la synthèse d'ADNc. La réaction est stoppée en plaçant les échantillons sur glace et l'enzyme est dénaturée à la suite d'une dernière incubation de 5 minutes à 95°C. Les échantillons d'ADNc sont stockés à -20°C.

3. PCR en temps réel

a. Matériel

Tableau II.7

b. Méthode

La PCR en temps réel est effectuée en plaque 96 puits, avec l'ADNc obtenu par rétro-transcription. Afin d'obtenir une concentration finale de 5 ng, l'ADNc est dilué 100 fois dans de l'eau milliQ, et 5 µl sont introduits par puits. Un mélange réactionnel est préparé contenant respectivement 2,5 µl d'amorces sens et anti-sens à une concentration finale de 300 nM (référénciées dans le tableau II.8), 12,5 µl de SYBR Select Master Mix 1x et 2,5 µl d'eau milliQ. 20 µl de mélange réactionnel sont ajoutés aux 5 ng d'ADNc. Chaque échantillon est testé en duplicata. Pour éviter une évaporation, la plaque est scellée par un papier adhésif. Elle est centrifugée une minute à 600 rpm (Centra CL3R, Thermo IEC, Rotor : IEC 243) et introduite dans la machine à PCR StepOnePlus. Les amplifications sont effectuées par le programme suivant : une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C suivie de 40 cycles de 15 secondes à 95°C (dénaturation) et une minute à 60°C (hybridation des amorces et élongation). Les données obtenues sont analysées par l'intermédiaire du programme « thermal cycler software ». L'abondance relative des transcrits est déterminée en appliquant la différence des Ct (Schefe et al., 2006) et en normalisant avec le gène de référence GAPDH, dont l'expression n'est pas modifiée dans nos conditions expérimentales.

V. Extraction de protéines, dosage protéique et Western Blot

Le Western Blot (WB) permet de détecter et de quantifier l'abondance de protéines présentes dans un lysat cellulaire. Les protéines, préalablement dénaturées, sont séparées sur un gel de polyacrylamide SDS-page. Les conditions dénaturantes utilisées permettent une séparation des protéines uniquement en fonction du poids moléculaire. Les protéines sont ensuite

Tableau II.9 : Matériel nécessaire à la lyse cellulaire et l'extraction de protéines

Nom	Firme, pays
PBS (1 l) <ul style="list-style-type: none">- 9 g NaCl- 20 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4- Eau milliQ	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Tampon de lyse DLA (25 ml, pH 8,5) <ul style="list-style-type: none">- 3,8 g Urée 7M- 10,5 g Thiourée 2M- 0,5 g Chaps 2%- 0,5g ASB 14 2%- 91g Tris 30mM	Merck Millipore, USA Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA MP Biomedicals, USA
Grattoir	TPP, Suisse
Sonificateur	Hielscher, Allemagne
Thermomixer	Eppendorf, Germany
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne

Tableau II.10: Matériel nécessaire au dosage protéique

Nom	Firme, pays
Plaque 96 puits	Greiner Bio-One, Autriche
Eau milliQ	
Albumine serique bovine (BSA) 2 µg/µL	Santa Cruz Biotechnology, USA
Pierce 660 Protein Assay	Thermo Scientific, USA
«Ion detergent compatibility reagent »	Thermo Scientific, USA
Mark Microplate Spectrophotometer	Bio-Rad, USA
Logiciel « Microplate Manager 6 software »	Bio-Rad, USA

transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF). Cette membrane est mise en contact avec des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt. La révélation de ces protéines est finalement permise par l'utilisation d'un second anticorps couplé à un fluorochrome, reconnaissant l'anticorps primaire. L'intensité de fluorescence émise permet la détection et la quantification relative de l'abondance des protéines d'intérêt entre les conditions expérimentales.

4. Lyse cellulaire et extraction de protéines

a. Matériel

Tableau II.9

b. Méthode

Dans un premier temps, lorsque les cellules arrivent à sénescence répllicative ou aux différents temps après la dernière exposition aux UVB, les cellules peuvent être lysées et les protéines extraites. Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées au PBS. 150 µl du tampon d'extraction DLA (composition référencée dans le Tableau II.9) sont ajoutés par T75, ou 50 µl par T25. Les cellules sont raclées à l'aide d'un grattoir et le lysat est récupéré dans un eppendorf. Le lysat est ensuite soniqué trois fois 10 secondes pour briser la chromatine, puis mixé durant 15 minutes à 12°C dans un Thermomixer. Afin d'éliminer les débris cellulaires, le lysat est centrifugé 10 minutes à 13 000 rpm (centrifuge 5415 D, Eppendorf, Germany, Rotor : F45-24-11). Le surnageant contenant les protéines est stocké à -80°C. Un aliquot de 10 µl est également préparé pour le dosage protéique.

5. Dosage protéique

a. Matériel

Tableau II.10

b. Méthode

La concentration en protéines du lysat cellulaire est déterminée par utilisation de la méthode de Pierce 660 nm. Le Pierce est un composé métal-sonde qui, en condition acide, se lie aux protéines, principalement au niveau des acides aminés basiques. Lié, le complexe présente un shift d'absorbance mesurable à 660 nm, passant du brun au bleu-vert. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité des protéines présentes dans le lysat. La concentration en protéines est déterminée par mesure de l'absorbance et en se basant sur l'absorbance d'un échantillon à concentration connue.

Le dosage se fait en plaque 96 puits et les mesures sont faites en duplicata. 9 µl d'eau milliQ et 1 µl d'échantillon à doser sont déposés par puits. Pour la réalisation de la droite d'étalonnage, nous utilisons de l'albumine sérique bovine (BSA) de concentration stock connues (2 µg/ µl) diluée de 0 à 10 µg (0, 1, 2,5, 5, 7,5, et 10 µg). Un « blanc » composé de 1 µl de tampon de lyse DLA et 9 µl d'eau milliQ est également préparé. 150 µl de réactif de Pierce auquel a préalablement été ajouté du ion detergent compatibility reagent (IDCR) sont ensuite déposés par puits. Après 5 minutes d'incubation, la réaction colorimétrique se stabilise et l'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660 nm.

Tableau II.11 : Matériel nécessaire au Western Blot

Nom	Firme, pays
Eau milliQ	
Bleu de charge 5x (17,5 ml) <ul style="list-style-type: none"> - 5 ml Tris HCl 0,5 M pH 6,8 - 5 ml SDS 20% - 2,5 ml β-mercaptoéthanol - 5 ml glycérol 85% - 8,75 mg bleu de bromophénol 	Merck Millipore, USA MP Biomedicals, USA Fluka, USA Merck Millipore, USA GE Healthcare, UK
Centrifugeuse	Eppendorf, Germany
Gels précoulés Mini-PROTEAN TGX, 15 puits, 12% ou 4-20 % polyacrylamide (et cuve associée)	Bio-Rad, USA
Tampon de migration 10x (1 l, pH entre 8,4 et 8,8) <ul style="list-style-type: none"> - 30 g Tris - 144 g glycine - 10 g SDS - Eau milliQ 	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA MP Biomedicals, USA
See Blue Plus 2 protein standard	Novex, USA
HiMark Pre-stained, HMW protein standard	Invitrogen, USA
Membrane de PVDF	Immobilon-FL, Merck Millipore, USA
Méthanol	Acros Organics, USA
Tampon de transfert liquide (1 l, pH 8,3) <ul style="list-style-type: none"> - 3,05 g Tris - 8,7 g glycine - Eau milliQ - 200 ml méthanol 	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Acros Organics, USA
PBS (1 l) <ul style="list-style-type: none"> - 9 g NaCl - 20 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - Eau milliQ 	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Solution bloquante Licor	LI-COR, USA
Tween20	Bio-Rad, USA
Scanner Odyssey	LI-COR, USA
Logiciel « odyssey V3.0 »	LI-COR, USA

6. Western blot

a. Matériel

Tableau II.11

b. Méthode

Les échantillons protéiques sont dilués afin d'obtenir une quantité de 15 ou 20 µg de protéines totales dans un volume final de 12 µl. Sous hotte chimique, 3 µl de bleu de charge concentré 5x (composition référenciée dans le tableau II.11) sont ajoutés au mélange. Les échantillons sont portés à 100°C pendant 5 minutes, permettant, avec la présence du β-mercaptoéthanol, la dénaturation des protéines. Les échantillons sont ensuite centrifugés durant 10 minutes à 13 000 rpm (Minispin, Eppendorf, Germany, Rotor : F45-12-11). 15 µl d'échantillon (5 µl d'étalon de poids moléculaire), sont chargés par puits sur gels pré-coulés de poly-acrylamide 4-20%. La cuve est remplie avec du tampon de migration et soumise à un courant de 70 Volt pendant 45 minutes suivies de 45 minutes à 140 Volt. La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol arrive en fin de migration.

Les membranes utilisées pour les transferts des protéines sont des membranes PVDF (polyvinylidène fluoride). Avant utilisation, la membrane est activée dans du méthanol durant une minute puis rincée durant 10 minutes dans du tampon de transfert. Une fois la migration finie, le gel est placé en « sandwich », sur la membrane PVDF, entre 4 papiers wattman et 2 éponges. Les éponges et les papiers Wattman ont préalablement été humidifiés dans du tampon de transfert froid. Le montage est placé dans une cuve de transfert remplie de tampon de transfert froid. Les protéines sont transférées du gel vers la membrane sous un voltage de 70 Volt durant 2 heures. Après le transfert, la membrane est bloquée à température ambiante durant 1 heure dans du PBS-Licor (50% - 50%). La membrane est incubée overnight à 4°C avec l'anticorps primaire (référénciés dans le tableau II.12) dirigé contre la protéine d'intérêt et dilué dans du Licor-Tween20 0,1%. La membrane est ensuite rincée 4 fois durant 5 minutes avec du PBS-Tween20 0,1%. La membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (référénciés dans le tableau II.12) durant une heure à température ambiante. La membrane est rincée quatre fois durant 5 minutes avec du PBS-Tween20 0,1% et deux fois avec du PBS, avant d'être séchée entre deux papiers Wattman pendant 30 minutes.

La révélation des anticorps se fait au scanner Odyssey, et le logiciel Odyssey V3.0 est utilisé pour quantifier l'abondance relative des protéines. Le contrôle de charge utilisé est soit la tubuline soit l'actine.

VI. Immunofluorescence

L'immunofluorescence permet la visualisation de protéines (ou d'autres molécules) d'intérêt au sein de cellules, via l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes. Après fixation et perméabilisation des cellules, le marquage se fait par utilisation de deux anticorps. Le premier anticorps, l'anticorps primaire, est non fluorescent et permet de marquer l'antigène cible au sein de la cellule. Ensuite, l'anticorps secondaire, couplé au fluorochrome, est dirigé contre l'anticorps primaire. La visualisation se fait par microscopie confocale. En excitant le fluorochrome de l'anticorps secondaire, celui-ci réémet un rayon lumineux qui peut être capté par le microscope.

Tableau II.12 : Anticorps primaires utilisés au Western Blot

Anticorps	Poids moléculaire	Clonalité	Source	Dilution	Firme	Référence
ATM	350 kDa	monoclonal	souris	1 :4 000	GeneTex	GTX70103
ATR	300 kDa	monoclonal	souris	1 :1 000	GeneTex	GTX70109
BRCA	220 kDa	polyclonal	rabbit	1 :1 000	Cell Signaling Technology	#9010
CHK1	56 kDa	monoclonal	souris	1 : 1 000	Cell Signaling Technology	#2360
CHK 2	62 kDa	polyclonal	rabbit	1 :2 000	Cell Signaling Technology	#2662
P-ATM	350 kDa	monoclonal	rabbit	1 :1 000	Cell Signaling Technology	#5883
P-ATR	300 kDa	polyclonal	rabbit	1 :1 000	Cell Signaling Technology	#2853
P-BRCA	220 kDa	polyclonal	rabbit	1 :1 000	Cell Signaling Technology	#9009
P-CHK1	56 kDa	monoclonal	rabbit	1 :1 000	Cell Signaling Technology	#2348
P-CHK2	62 kDa	monoclonal	rabbit	1 :1 000	Cell Signaling Technology	#2197
P-P53	53 kDa	monoclonal	souris	1 :1 000	Cell Signaling Technology	#9286
p16 ^{INK4a}	16 kDa	monoclonal	rabbit	1 :500	LifeSpan BioScience	#LS-B8693
p21 ^{WAF-1}	21 kDa	monoclonal	souris	1 :1 000	Cell Signaling Technology	#2946
p53	53 kDa	monoclonal	souris	1 :1 000	Millipore	#05-224
β-actine	42 kDa	monoclonal	souris	1 :20 000	Sigma Aldrich	A5441
α-tubuline	55 kDa	monoclonal	souris	1 :20 000	Sigma Aldrich	T5168
Anti-souris (rouge)	/	polyclonal	Chèvre	1 :10 000	LI-COR	#926-32211
Anti-souris (vert)	/	polyclonal	Chèvre	1:10 000	LI-COR	#926-32210
Anti-lapin (vert)	/	polyclonal	Chèvre	1:10 000	LI-COR	#926-32211

Tableau II.13 : Matériel nécessaire à l'immunofluorescence

Nom	Firme, pays
PBS (1 l) <ul style="list-style-type: none">- 9 g NaCl- 20 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4- Eau milliQ	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Paraformaldéhyde	Merck Millipore, USA
Méthanol	Acros Organics, USA
Acétone	Merck Millipore, USA
Triton X100	Sigma-Aldrich, USA
BSA	Santa Cruz Biotechnology, USA
Hoechst	Molecular Probes, USA
TO-PRO-3	Molecular Probes, USA
RNase	Sigma, USA
Lames porte-objets	VWR, USA
Mowiol	Sigma-Aldrich, USA
Microscope confocal	Leica, Allemagne
HCl 2M	Merck Millipore, USA
Sérum de bovin foetal	Gibco, USA

Tableau II.14: Anticorps utilisés en immunofluorescence

Anticorps	Clonalité	Source	Dilution	Fixation	Firme	Référence
(6-4)PP	monoclonal	souris	1 :300	PFA	Cosmo Bio Co	NMDND002
CPD	monoclonal	souris	1 :300	PFA	Cosmo Bio Co	NMDND001
KI-67	polyclonal	souris	1 :800	PFA	Cell Signaling Technology	#9449
Nrf 2	polyclonal	lapin	1 :50	PFA	Santa Cruz Biotechnology	SC-13032
P-ATM	monoclonal	lapin	1 :100	PFA	Cell Signaling Technology	#5883
P-ATR	polyclonal	lapin	1 :100	PFA	Cell Signaling Technology	#2853
P-BRCA	polyclonal	lapin	1 :100	PFA	Cell Signaling Technology	#9009
P-CHK1	monoclonal	lapin	1 :100	PFA	Cell Signaling Technology	#2348
P-CHK2	monoclonal	lapin	1 :100	PFA	Cell Signaling Technology	#2197
P-H2AX	monoclonal	lapin	1 :300	PFA	Cell Signaling Technology	#9718
P-P53	monoclonal	souris	1 :100	PFA	Cell Signaling Technology	#9286
p16 ^{INK4a}	monoclonal	lapin	1 :100	Met-AC	LifeSpan BioScience	#LS-B8693
p21 ^{WAF-1}	monoclonal	lapin	1 :400	PFA	Cell Signaling Technology	#2947
PCNA	monoclonal	souris	1:1 000	Met-AC	Cell Signaling Technology	#2586
Anti-lapin (vert)	polyclonal	chèvre	1:1 000	/	Molecular Probes	#A11008
Anti-lapin (rouge)	polyclonal	chèvre	1:1 000		Molecular Probes	#A11036
Anti-souris (vert)	polyclonal	chèvre	1:1 000	/	Molecular Probes	#A11001
Anti-souris (rouge)	polyclonal	chèvre	1:1 000	/	Molecular Probes	#A11004

a. Matériel

Tableau II.13

b. Méthode

A 24 heures avant la manipulation, les cellules sont repiquées à 40 000 cellules par couvre-objet (ou 24h avant stress UVB, si celui-ci est réalisé directement sur couvre-objets). Pour fixer les cellules (1h, 24h, 48h et 72h après la dernière exposition aux UVB), le milieu de culture est décanté et 300 µl de PBS + 4% paraformaldéhyde (PFA) ou de méthanol-acétone (80%-20%) sont ajoutés durant 10 minutes. Les cellules fixées sont rincées trois fois au PBS. Dans le cas d'une fixation à la PFA, une étape supplémentaire de perméabilisation avec du PBS + 1% TritonX-100 durant 5 minutes est effectuée, suivi de 3 rinçages au PBS. Pour éviter un marquage aspécifique par l'anticorps primaire, les couvre-objets sont lavés trois fois 10 minutes au PBS + 3% de Bovin serum albumine (BSA). Une chambre humide est préparée, constituée d'un papier Wattman humidifié recouvert de parafilm. 30 µl d'anticorps primaire (référénciés dans le tableau III.14) dilué dans du PBS + 3% BSA à la dilution adéquate sont déposés sur le parafilm. Les couvre-objets sont mis en contact de ces anticorps. La chambre humide est scellée par du parafilm et l'incubation se fait overnight à 4°C.

Le lendemain, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS + 3% BSA. Une chambre humide est préparée et 30 µl d'anticorps secondaire (référénciés dans le Tableau II.14) dilué 1000 fois dans du PBS + 3% BSA y sont déposés. Les couvre-objets sont mis en contact et incubés durant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont rincées trois fois au PBS. Les noyaux sont marqués avec 30 µl de TO-PRO3, préalablement dilué 80 fois dans de la RNase, durant 35 minutes dans une chambre humide, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Finalement, les cellules sont rincées trois fois au PBS et les couvre-objets sont montés sur lames de microscope avec du Mowiol préchauffé à 60°C. Les lames peuvent être conservées à 4°C avant d'être observées au microscope confocal.

Le marquage pour les CPDs et (6-4)PPs, requiert un traitement spécifique et une étape supplémentaire permettant la dénaturation de l'ADN cellulaire. Après la fixation à la PFA, les cellules sont perméabilisées 5 minutes dans du PBS + 0,5% TritonX100, puis les cellules sont incubées pour 30 minutes avec de l'HCl 2N. Le blocking se fait durant 30 minutes au PBS + 20% FBS et les anticorps sont dilués dans du PBS + 5% FBS. Tous les rinçages se font au PBS sans ajout de BSA.

VII. Mesure des ROS

La méthode de cytométrie en flux (de l'anglais Fluorescence Activated Cell Sorter ou FACS), permet de caractériser les cellules au sein d'une population (ou autres particules) selon plusieurs critères (taille, granulosité, marquages,...). Pour ce faire, les cellules, sont envoyées de manière séparée à travers différents lasers. Sur base de la réémission du faisceau lumineux (par diffusion ou fluorescence), les cellules sont caractérisées.

Durant ce mémoire, nous avons voulu analyser la production des radicaux libres de l'oxygène (de l'anglais reactive oxygen species ou ROS) produits au sein des cellules sénescents suite aux expositions aux UVB. Une sonde fluorescente a été utilisée : le 5-(et-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCF). Cette sonde reconnaît tous les types de ROS et n'est donc pas spécifique à une espèce. Au départ, la sonde se retrouve sous forme réduite et non fluorescente. Une fois qu'elle pénètre au sein des cellules, son groupement lipophile est clivé par des estérases, séquestrant la sonde au sein des cellules. En présence des ROS spécifiques, la sonde est oxydée, la rendant ainsi fluorescente.

Tableau II.15 : Matériel nécessaire pour la mesures des ROS par sonde DCF et FACS

Nom	Firme, pays
Trypsine + 0,05% EDTA	Gibco, USA
PBS + 10% sérum - PBS stérile - Sérum de bovin foetal	Lonza, Suisse Gibco, USA
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne
CM-H ₂ DCF	Life Technologies, USA
SIN-1 Hydrochloride	Invitrogen, USA
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Gibco, USA

Cette fluorescence émise est détectée par les faisceaux du FACS, permettant de séparer les cellules en fonction de l'existence d'un signal fluorescent ou pas.

a. Matériel

Tableau II.15

b. Méthode

A 48h après le dernier stress aux UVB, les cellules sont repiquées en plaque 6- puits à 200 000 cellules par puits.

Le lendemain, le milieu est décanté et les cellules sont rincées deux fois au PBS. Ensuite, 1 ml de trypsine + 0,05% EDTA est ajouté par puits et les cellules sont placées quelques minutes à 37°C. Lorsque les cellules sont détachées, l'action de la trypsine est inhibée en ajoutant 2 ml de PBS + 10% FBS par puits. La solution est récupérée dans des tubes spécifiques au FACS.

Les cellules sont centrifugées durant 8 minutes à 1 200 rpm. Les surnageants sont décantés et les culots resuspendus dans 100 µl de mix de sonde préalablement préparés. Pour les conditions tests, 1 µl de sonde CM-H₂DCF est dilué dans 99 µl de Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) afin d'obtenir au final une concentration de 2,5 µM. Pour le contrôle négatif, seul 100 µl de HBSS sont ajoutés par tube. Pour les contrôles positifs, 5 µl de SIN-1 Hydrochloride (libérant de l'acide nitrique en solution) sont ajoutés à 95 µl de mix de sonde préalablement préparés de façon à avoir au final une concentration de 0,5 mM en SIN-1 Hydrochloride. Après l'ajout des mix, les tubes sont vortexés délicatement et incubés durant 20 minutes à 37°C, à 5% de CO₂ et à l'abri de la lumière. Puis, 500 µl de HBSS froid sont ajoutés par tube avant de les centrifuger durant 8 minutes à 1 200 rpm. Les culots sont resuspendus dans 500 µl de HBSS froid et centrifugés durant 8 minutes à 1 200 rpm. Les culots sont finalement resuspendus dans 500 µl de HBSS froid. Les tubes sont placés sur de la glace à l'abri de la lumière. La lecture aux FACS est effectuée en suivant les instructions du fabricant.

VIII. Tests statistiques

Les tests statistiques ont été effectués par un test ANOVA simple. Les tests pairés ont été faits par le Tukey test (NS : non significatif, * : 0,05 > P > 0,01, ** : 0,01 > P > 0,001, *** : P < 0,001).

RESULTATS

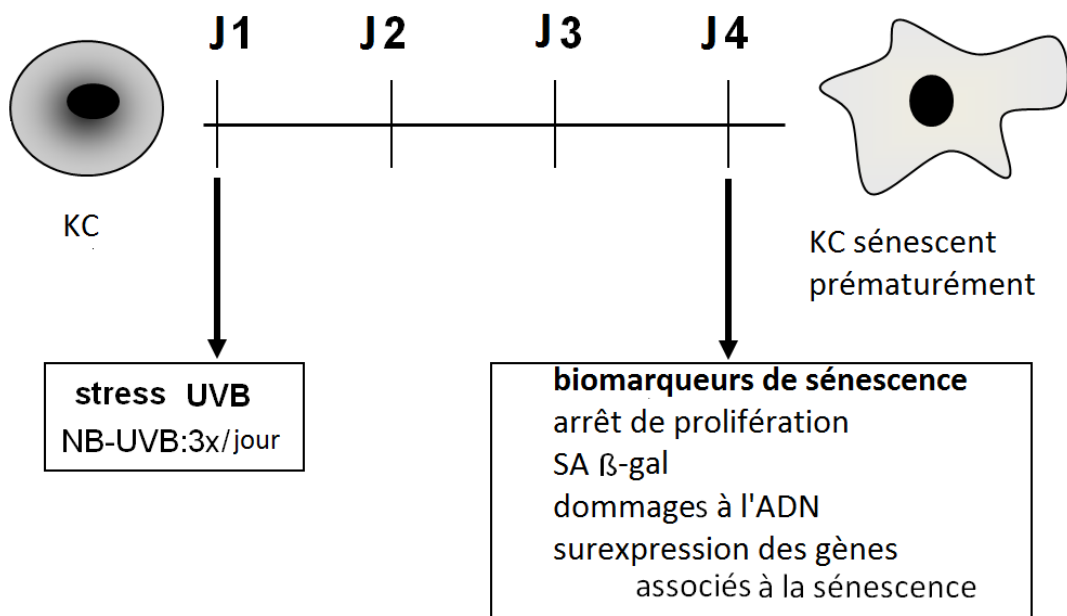


Figure III.1: Représentation schématique du modèle de SIPS-UVB. Les kératinocytes (en passages 6) sont repiqués, 72h avant les expositions aux UVB. Au jour 1, ils sont exposés à 3 stress de 675 mJ/cm^2 espacés de trois heures. A 72h après la dernière exposition, au jour 4, les biomarqueurs de sénescence sont étudiés.

L'objectif principal de ce mémoire était d'investiguer les voies de signalisation impliquées dans l'apparition prématurée de la sénescence induite par les UVB chez les kératinocytes normaux humains (KC).

Nous avons d'abord étudié la présence de différents biomarqueurs de la sénescence dans deux modèles de sénescence: la sénescence répliquative (SR) et la sénescence induite par les stress UVB (SIPS-UVB). La sénescence répliquative est obtenue après un nombre élevé de passages en culture (entre le passage 11 et le passage 15 suivant le donneur), alors que la sénescence induite prématurément par des stress UVB (SIPS-UVB) consiste en une exposition d'UVB à 675 mJ/cm² (UVB à spectre étroit: Narrow band UVB ou NB-UVB), répétée trois fois sur une journée, avec un intervalle de 3 heures (Figure III.1).

Les biomarqueurs étudiés sont le changement de morphologie cellulaire, le pourcentage de cellules positives à l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal), les changements d'expression de gènes associés à la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire. Les deux modèles induisant les mêmes biomarqueurs, nous nous sommes ensuite intéressés aux voies de signalisation pouvant être impliquées dans l'apparition du phénotype sénescence induit par la SIPS-UVB. Nous nous sommes intéressés à la détection à long terme des dommages à l'ADN et à l'activation de la voie DDR (DNA Damage Repair), ainsi qu'à la présence de radicaux libres et à l'activation de Nrf-2.

I. Etude des biomarqueurs de la sénescence en SR et en SIPS-UVB

1. Morphologie cellulaire sénescence

Le changement de morphologie cellulaire est un biomarqueur facilement observable durant la sénescence. En effet, des études ont montré que les kératinocytes sénescents présentent une morphologie étalée et irrégulière ainsi qu'une augmentation de taille, en comparaison avec des kératinocytes jeunes. Cette augmentation est due à une augmentation du volume du cytoplasme et du nombre de vacuoles de dégradation (Kang et al., 2003, Kurz et al., 2000).

Les micrographies présentées à la figure III.2 ont été prises tous les deux passages (P4, P6, P8, P10, P11, P12) pour la SR, et 72h après le dernier stress pour la SIPS-UVB (Figure III.2).

Sur la figure III.2.A (SR), on observe qu'au fur et à mesure des passages, les cellules s'étalent de plus en plus et que leurs contours deviennent irréguliers. En effet, les cellules en passages précoces (P4 et P6) présentent une morphologie régulière et polygonale (10-20 μ m de diamètre) typique des kératinocytes, alors que la morphologie des cellules en passages tardifs (P10 et P12) devient irrégulière et présente une taille plus importante, comme décrit par Soroka et al. (Soroka et al., 2008).

Les micrographies de la figure III.2.B (SIPS-UVB), montrent que les cellules contrôles ont une morphologie identique à celle des cellules jeunes (régulière et polygonale). En revanche, les cellules exposées trois fois aux UVB, présentent une morphologie de forme irrégulière et une taille plus importante, mais sans atteindre la taille des cellules en sénescence répliquative.

Ces résultats montrent que les kératinocytes en SR ou en SIPS-UVB présentent des modifications de morphologie spécifiques de la sénescence. Toutefois, ce biomarqueur n'est pas suffisant pour établir que les cellules sont bien en sénescence. D'autres biomarqueurs doivent donc être étudiés.

A

100x

200x

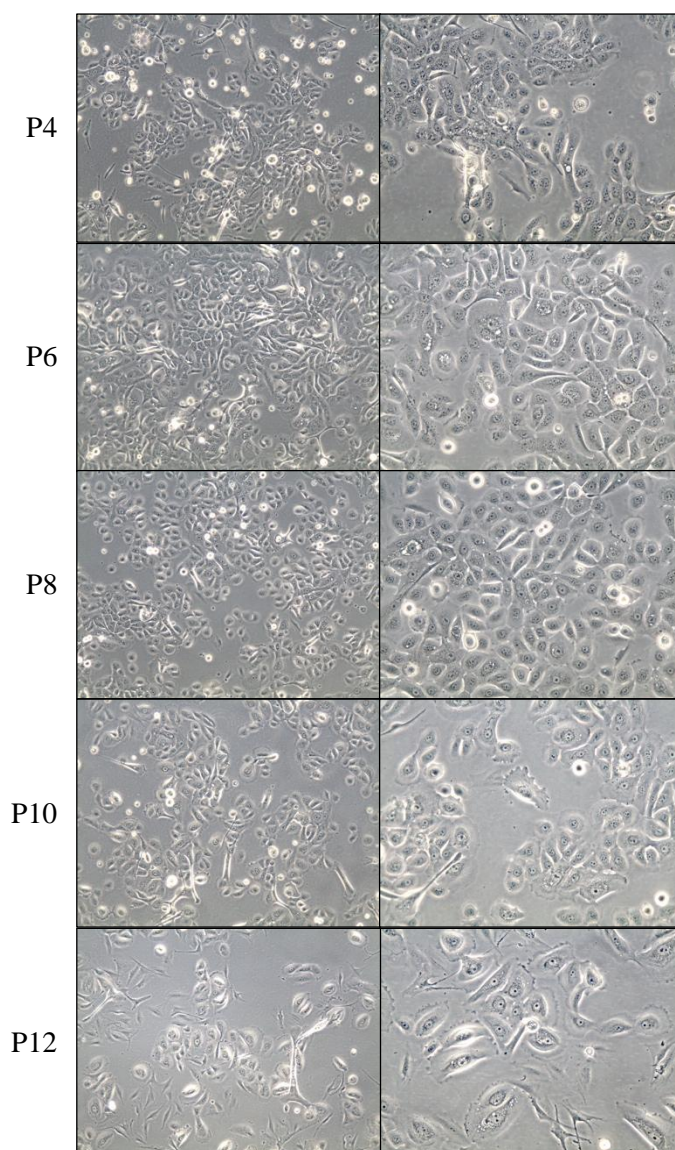
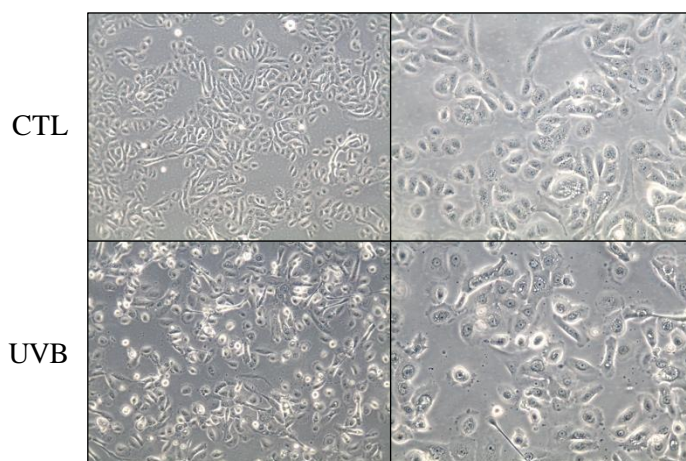
**B**

Figure III.2: Changements morphologiques observés chez les kératinocytes normaux humains (KC) en sénescence répliative (SR) ou en SIPS-UVB. A. Pour la SR, les KC sont cultivés et repiqués jusqu'à atteindre la SR (passage 12). Les micrographies sont prises tous les deux passages (P4, P6, P8, P10, P12). **B.** Pour la SIPS-UVB, les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les micrographies présentent la morphologie des KC à 72h après le dernier stress. Observation en microscopie photonique en contraste de phase et au grossissement de 100 et 200 fois.

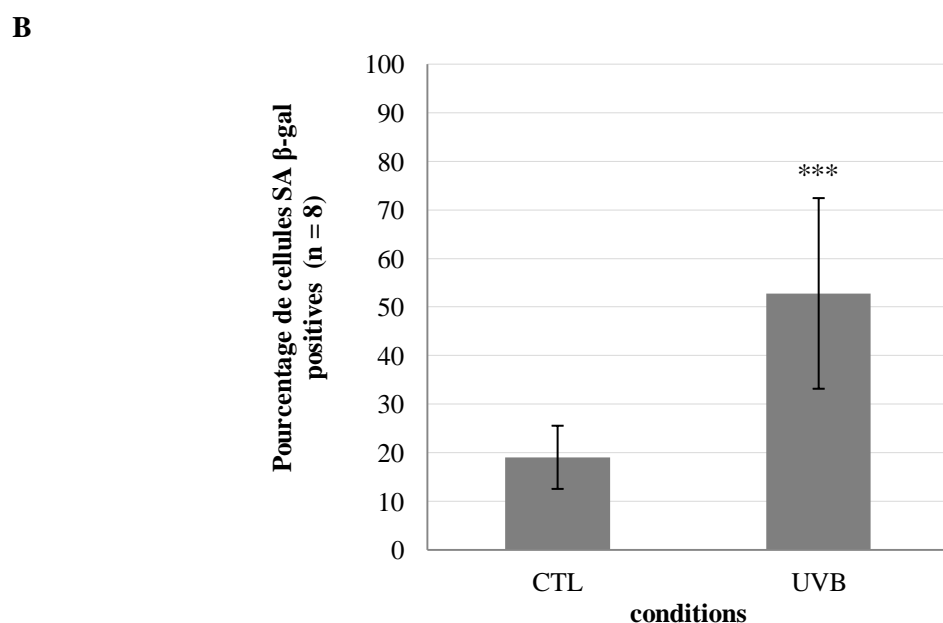
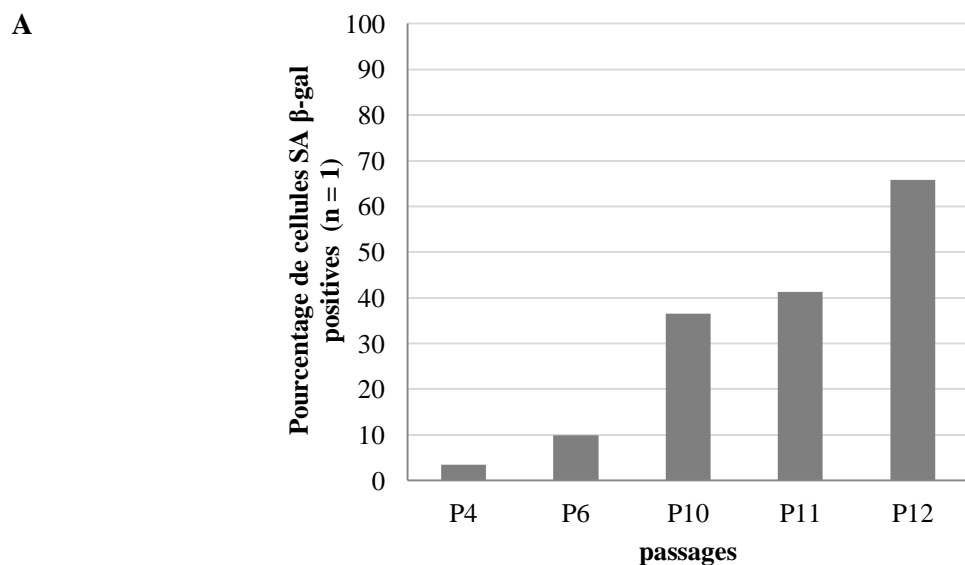


Figure III.3: Détection de l'activité SA-βgal observée chez les kératinocytes (KC) en sénescence répliative (SR) ou en SIPS-UVB. Pour la SR, les KC sont cultivés jusqu'à atteindre la SR (passage 12). Pour la SIPS-UVB, les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. La proportion de KC positifs à la SA-βgal est déterminée par le rapport entre les cellules positives et les cellules totales, en comptant 400 cellules par puits (sur 3 puits). **A.** Pourcentage de KC positifs à la SA-βgal en fonction du nombre de passages jusqu'à la SR (P12) (n = 1) **B.** Pourcentage de KC positifs à la SA-βgal en SIPS-UVB à 72h après le dernier stress. Les résultats représentent la moyenne de 8 échantillons (± écart-type). Les tests statistiques ont été effectués par un test d'ANOVA païré suivis d'un test Tukey (***) : P < 0,001).

Gènes	RS			SIPS-UVB		
	Moyenne (n = 3)	Ecart- type	P value	Moyenne (n = 6)	Ecart- type	P value
<i>p16^{Ink4a}</i>	12,18	12,37	ns	2,03	0,79	ns
<i>p21^{WAF-1}</i>	2,76	3,88	ns	1,62	1,82	ns
<i>Apolipoprotéine J</i>	1,04	0,54	ns	3,69	2,89	ns
<i>Fibronectine</i>	7,31	2,78	ns	8,20	4,26	ns
<i>MMP9</i>	3,90	2,98	ns	16,68	20,87	*

Table III.1: Tableau reprenant l’expression des gènes associés à la sénescence dans des kératinocytes (KC) en sénescence répliative (SR) ou enSIPS-UVB. Pour la SR, des extraits sont réalisés à passage précoce (P6) ou tardif (P12). Pour la SIPS-UVB, des extraits sont réalisés à 72h après le dernier stress, dans des KC exposés (ou non exposés: CTL) à trois stress UVB de 675 mJ/cm². La GAPDH a été utilisée comme gène de référence. Le tableau reprend les moyennes des rapport d’expression, les écart-types (P12/P6 (RS) (n = 3) ou UVB/CTL (SIPS-UVB) (n = 6)) et les valeur P. Les tests statistiques ont été effectués par un test d’ANOVA païré suivis d’un test Tukey (* : 0,05 < P < 0,01).

2. Activité β -galactosidase associée à la sénescence

L'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal) est un biomarqueur fréquemment utilisé, *in vitro* et *in vivo*, pour visualiser des cellules en sénescence (Debacq-Chainiaux et al., 2009, Dimri et al., 1995). En utilisant un composé chromogénique, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside ou X-gal, l'activité de l'enzyme lysosomiale β -galactosidase peut être visualisée au sein des cellules sénescents à un pH suboptimal de 6,0.

Nous avons suivi la présence de ce marqueur dans une culture de KC, tous les deux passages, et ce jusqu'en passage 12, pour la SR (n = 1), et à 72h après le dernier stress UVB pour la SIPS-UVB (n = 8) (excepté pour P8) (Figure III.3).

Le pourcentage de cellules positives pour l'activité SA- β gal augmente progressivement avec les passages en culture avec une augmentation plus importante aux passages tardifs, atteignant ainsi 66 % de cellules positives en passage 12 contre seulement 3 % en passage 4 (n = 1) (Figure III.3.A).

Une augmentation de la proportion de cellules positives à cette activité est également démontrée lors de la SIPS-UVB, où on dénombre en moyenne 58 % de cellules positives pour l'activité SA- β gal dans les cultures exposées aux UVB, et seulement 21 % dans les cultures CTL (n = 8) (Figure III.3.B).

Ces résultats indiquent que les cultures de kératinocytes en passage tardif (SR) ou en SIPS-UVB présentent une proportion plus importante de cellules sénescents que dans les cultures contrôles respectives, confirmant que les deux modèles de sénescence du kératinocyte utilisés induisent la sénescence.

3. Changement d'expression de gènes associés à la sénescence

Des changements d'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire ($p16^{\text{INK4A}}$ et $p21^{\text{WAF-1}}$), la survie cellulaire (ApolipoprotéineJ) et la composition de la matrice extracellulaire (Fibronectine et MMP9) sont connus pour être surexprimés en sénescence chez les fibroblastes humains normaux de derme, mélanocytes ou kératinocytes humains normaux oraux (Dumont et al., 2000, Gonos et al., 1998, Kang et al., 2003, Toussaint et al., 2000). Pour observer s'il en est de même pour les kératinocytes épidermiques en sénescence, l'expression de ces gènes a été étudiée en sénescence répliquative et en SIPS-UVB (Table III.1).

Les modifications d'expression génique ont été étudiées pour la SR sur des cellules en passage précoce (P6) et tardif (P12) (n = 3), et à 72h après le dernier stress pour la SIPS-UVB (n = 6).

En condition de sénescence répliquative, en comparaison avec le passage précoce, on observe une augmentation de l'abondance relative en ARNm de $p16^{\text{INK4A}}$ (12,2x), $p21^{\text{WAF-1}}$ (2,8x), ApolipoprotéineJ (1x), Fibronectine1 (7,3x) et de MMP9 (3,9x) (Table III.1).

Pour la SIPS-UVB, en comparant les conditions UVB aux conditions CTL, une augmentation de l'abondance relative en ARNm est également observée en ce qui concerne $p16^{\text{INK4A}}$ (2x), $p21^{\text{WAF-1}}$ (1,6x), ApoJ (3,7x), FN1 (8,2x) et MMP9 (16,7x).

Cependant, les écart-types sont très importants ce qui semble être dû à une importante variabilité génétique entre les donneurs, et les différences ne sont donc pas significatives,

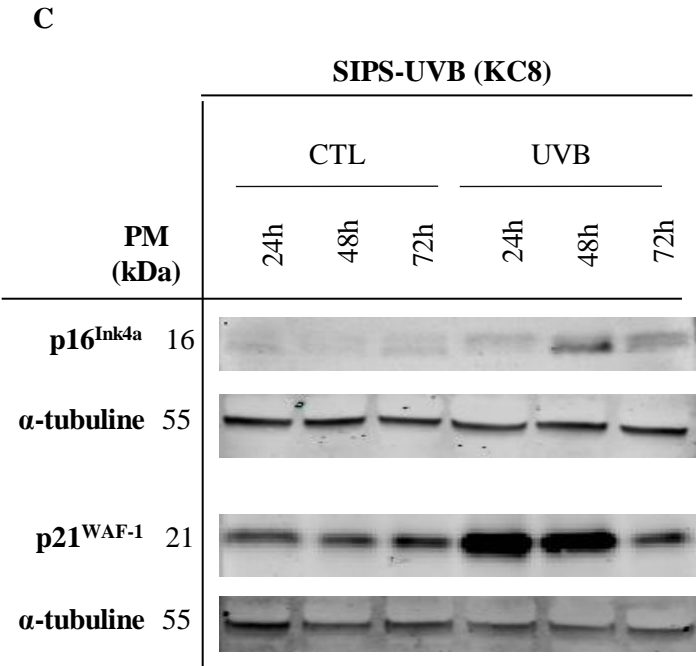
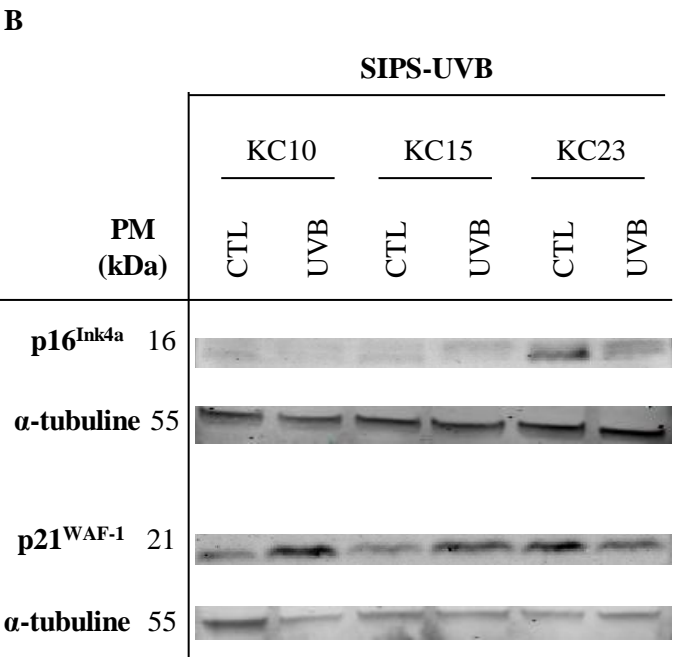
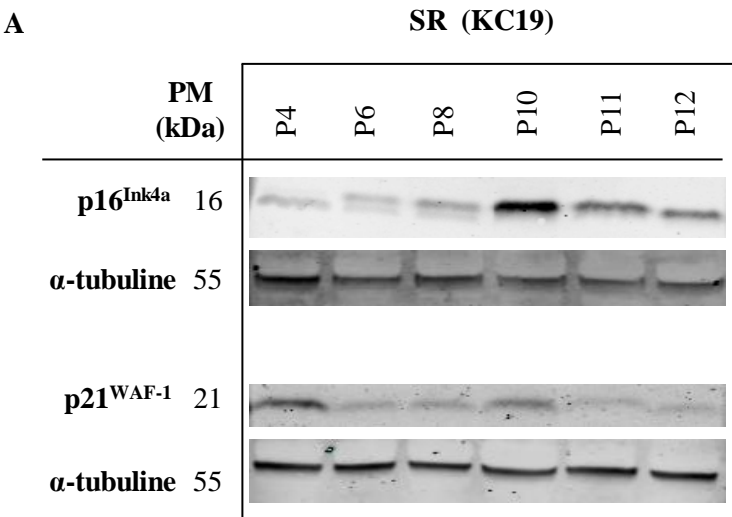


Figure III.4: Analyse par Western-Blot de l'abondance des protéines p16^{Ink4a} et p21^{WAF-1} dans les kératinocytes (KC) en sénescence répliative (SR) ou en SIPS-UVB. Pour la SR, des extraits sont réalisés tous les deux passages jusqu'au passage 12. Pour la SIPS-UVB, des extraits sont réalisés à 24h, 48h ou 72h après le dernier stress, dans des KC exposés (ou non exposés: CTL) à trois stress UVB de 675 mJ/cm². L'α-tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. **A.** Abondance de p16^{Ink4a} et p21^{WAF-1} en SR. **B.** Abondance de p16^{Ink4a} et p21^{WAF-1} en SIPS-UVB à 72h (3 donneurs : KC10, KC15, KC23). **C.** Abondance de p16^{Ink4a} et p21^{WAF-1} en SIPS-UVB à 24h, 48h et 72h après le dernier stress UVB (donneur KC8).

excepté pour le gène de MMP9 (Table III.1). Afin d'augmenter la significativité de nos résultats, il semble donc important d'inclure de nouveaux donneurs.

Toutefois l'expression des gènes $p16^{\text{INK4A}}$, $p21^{\text{WAF-1}}$, FN1 et MMP9 associés à la sénescence semble augmenter chez les kératinocytes, en SR et en SIPS-UVB, en comparaison aux conditions contrôles respectives (P6 et CTL). Ces résultats, sous réserve de confirmation en augmentant le nombre de donneurs, seraient donc en accord avec les modifications de l'expression de ces gènes chez les fibroblastes humains normaux de derme, les mélanocytes et les kératinocytes humains normaux oraux (Dumont et al., 2000, Gonos et al., 1998, Kang et al., 2003, Toussaint et al., 2000).

4. Arrêt du cycle cellulaire

La sénescence est liée à un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Deux voies maintiennent cet arrêt de prolifération : la voie $p53/p21^{\text{WAF-1}}$ et celle de $p16^{\text{INK4A}}/pRB$. Ces voies peuvent induire l'arrêt de manière indépendantes l'une de l'autre ou agir ensemble puisqu'elles sont interconnectées.

Des résultats préliminaires ont montré que les KC en SR ou en SIPS-UVB n'incorporaient plus, ou faiblement, de thymidine tritiée (données non montrées).

Afin de compléter les résultats obtenus pour $p16^{\text{INK4A}}$ et $p21^{\text{WAF-1}}$ au niveau de l'expression génique, nous avons étudié leur expression au niveau protéique. Pour les conditions de SR, l'abondance protéique est observée tous les 2 passages, de passage précoce (P4) jusqu'à passage tardif (P12) chez un donneur (KC19) (Figure III.4.A). En SIPS-UVB, les analyses ont été réalisées pour 3 donneurs à 72 h après le dernier stress (donneurs KC10, KC15, KC23) (Figure III.4.B). Une cinétique a été également réalisée à 24h, 48h ou 72h après le dernier stress UVB chez un autre donneur (KC8) (Figure III.4.C).

Pour la sénescence rélicative, une augmentation de l'abondance protéique de $p16^{\text{INK4A}}$ est observée pour les passages tardifs (P10 à P12, avec un maximum en P10) en comparant avec les passages précoces (P4 et P6) (Figure III.4.A). Ce résultat confirme celui obtenu pour l'abondance de l'ARNm. En revanche, l'abondance protéique de $p21^{\text{WAF-1}}$ diminue en SR durant les passages tardifs (P10 à P12) en comparaison avec les passages plus précoces (P4 et P6) (Figure III.4.A). Ce résultat ne confirme pas celui obtenu pour l'abondance de l'ARNm de $p21^{\text{WAF-1}}$.

Pour la SIPS-UVB, l'abondance protéique de $p16^{\text{INK4A}}$ et de $p21^{\text{WAF-1}}$ a été étudiée à 72h après la dernière exposition aux UVB ($n = 3$). Pour $p16^{\text{INK4A}}$ les résultats obtenus ne sont pas similaires entre les différentes cultures indépendantes étant donné qu'une diminution est mise en évidence chez un donneur (KC23) alors que l'abondance semble constante dans les deux conditions pour les autres donneurs (Figure III.4.B). Pour $p21^{\text{WAF-1}}$, une augmentation est observée dans les conditions UVB comparées aux conditions contrôles pour deux donneurs (KC10 et KC15) alors que pour la troisième culture (KC23), l'abondance de $p21^{\text{WAF-1}}$ semble diminuer après l'exposition aux UVB (Figure III.4.B).

Les résultats obtenus pour $p16^{\text{INK4A}}$ et $p21^{\text{WAF-1}}$ ne permettent pas de confirmer ceux obtenus pour l'abondance d'ARNm puisque la variabilité détectée ne permet pas de tirer de conclusions.

En conséquence et afin d'observer si l'abondance protéique de p16^{INK4A} et p21^{WAF-1} n'est pas modifiée à des temps plus précoces que 72h après l'exposition aux UVB, une cinétique à 24h, 48h et 72h a été réalisée (donneur KC8). Il en ressort que l'abondance de p16^{INK4A} est augmentée à 48h et légèrement à 72h dans la condition UVB. Pour p21^{WAF-1} une forte augmentation est observée à 24h et à 48h dans les conditions UVB (Figure III.4.C). Il serait donc intéressant de réaliser cette cinétique chez les trois autres donneurs.

Entre-temps, la caractérisation de l'arrêt du cycle cellulaire chez des kératinocytes en sénescence a été complétée par un marquage en immunofluorescence des CDKI, p16^{INK4A} et p21^{WAF-1}, ainsi que de deux protéines associées à la prolifération, Ki-67 et PCNA.

Pour les conditions de SR, les marquages en immunofluorescence ont été réalisés en passage précoce (P4) et tardif (P12) (n = 1). En SIPS-UVB, les marquages en immunofluorescence ont été réalisés à 72h après le dernier stress (n = 1) (Figure III.5 à Figure III.8).

En ce qui concerne le marquage de p16^{INK4A}, nous détectons un marquage nucléaire dans les KC à P4, et un marquage nucléaire plus intense en P12 (Figure III.5.A). De plus, nous observons un marquage cytoplasmique intense en P12. Nous confirmons la surexpression de p16^{INK4A} lors de la SR comme cela avait été mis en évidence par western blot.

Pour la SIPS-UVB, nous observons un marquage nucléaire plus intense dans les KC exposés aux UVB (Figure III.5.B).

L'analyse du marquage de p21^{WAF-1} montre également une localisation nucléaire et une diminution de l'abondance au passage tardif (P12) (Figure III.6.A), confirmant les résultats obtenus en western blot, et une augmentation du marquage dans les cellules exposées aux UVB (Figure III.6.B).

En parallèle, nous avons étudié l'expression de deux protéines intervenant dans la prolifération, Ki-67 et PCNA, par immunomarquages. Nous observons une localisation nucléaire des deux protéines ainsi qu'une diminution du nombre de noyaux marqués en passage tardif (Figure III.7.A et Figure III.8.A) et en SIPS-UVB (Figure III.7.C et Figure III.8.C).

La combinaison de la quantification du marquage de la protéine de Ki-67 avec la quantification de l'activité de la SA-βgal montre une tendance opposée au cours des différents passages jusqu'en sénescence répliative (Figure III.7.B), ainsi que pour la SIPS-UVB (Figure III.7.D). Ce résultat permet une évaluation plus exacte de la proportion de cellules sénescents au sein de la population (Lawless et al., 2010). Ces résultats confirment l'arrêt de prolifération en SR et en SIPS-UVB.

En conclusion des différents résultats obtenus en ce qui concerne l'expression de p16^{INK4A} et de p21^{WAF-1} (PCR en temps réel, western blot, immunomarquage), nous observons une abondance plus marquée de p16^{INK4A} en SR et une abondance plus marquée de p21^{WAF-1} en SIPS-UVB. Ces résultats semblent donc démontrer que l'arrêt de la prolifération ne dépend pas de mêmes voies en SR et SIPS-UVB.

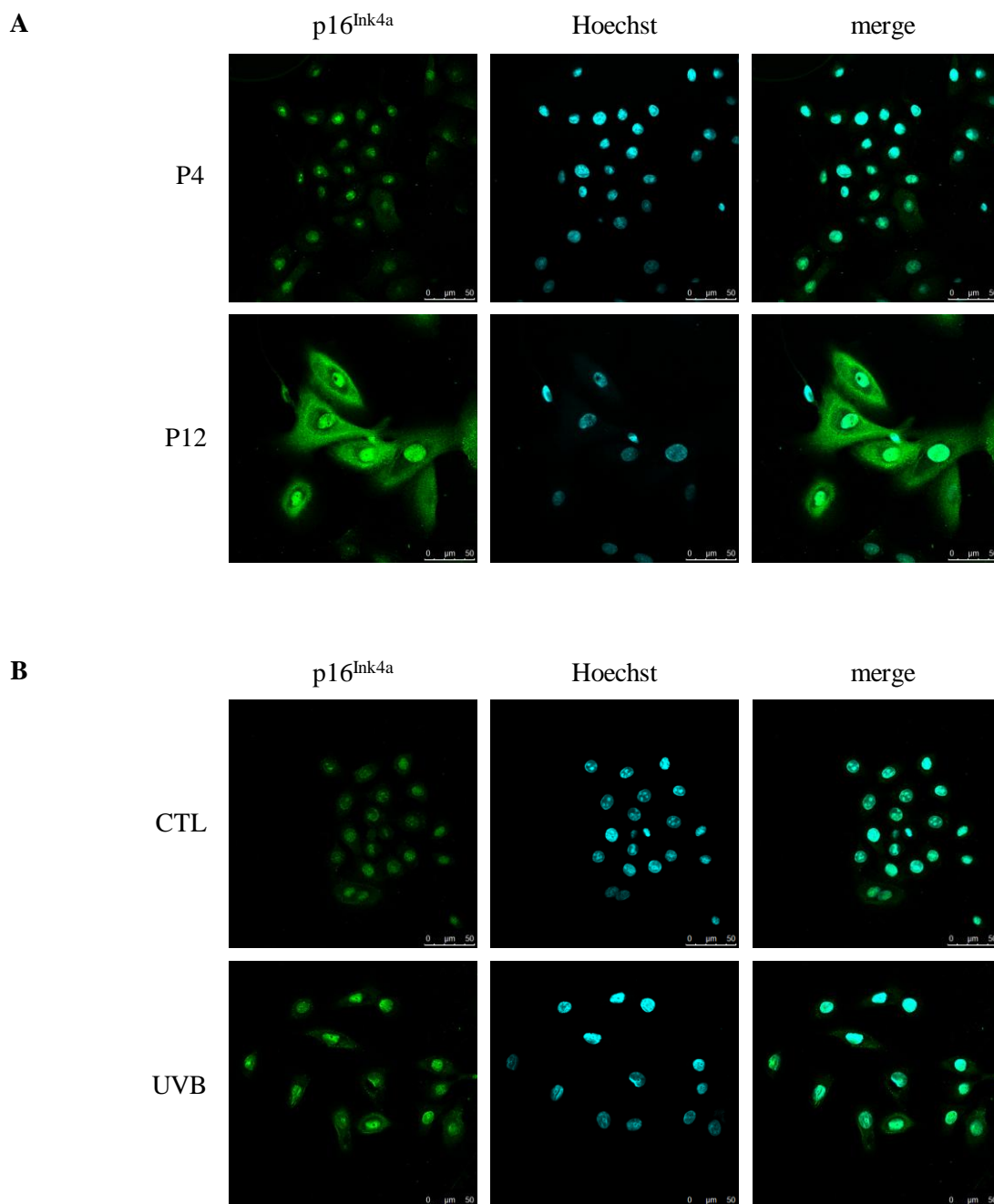


Figure III.5: Analyse par immunofluorescence de p16^{Ink4a} dans les kératinocytes (KC) en sénescence répllicative (SR) ou en SIPS-UVB. Pour la SR, les KC sont observés à passage précoce (P4) ou tardif (P12). Pour la SIPS-UVB, les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les immunomarquages sont réalisés aux passages P4 et P12 pour la SR (**A**), et à 72h après le dernier stress pour la SIPS-UVB (**B**). La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du Hoechst (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 50 µm.

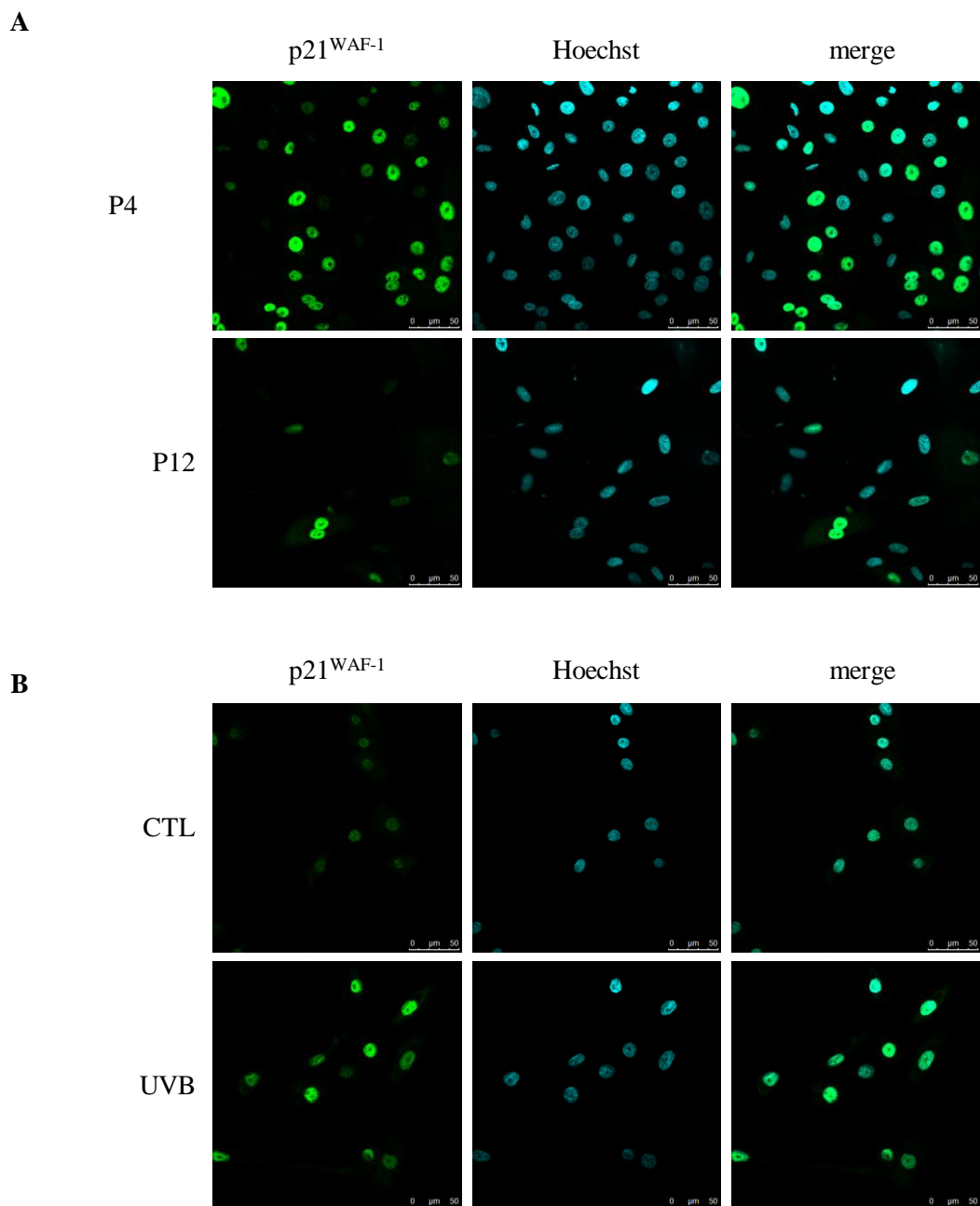


Figure III.6: Analyse par immunofluorescence de p21^{WAF-1} dans les kératinocytes (KC) en sénescence répllicative (SR) ou en SIPS-UVB. Pour la SR, les KC sont observés à passage précoce (P4) ou tardif (P12). Pour la SIPS-UVB, les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les immunomarquages sont réalisés aux passages P4 et P12 pour la SR (**A**), et à 72h après le dernier stress pour la SIPS-UVB (**B**). La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du Hoechst (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 50 µm.

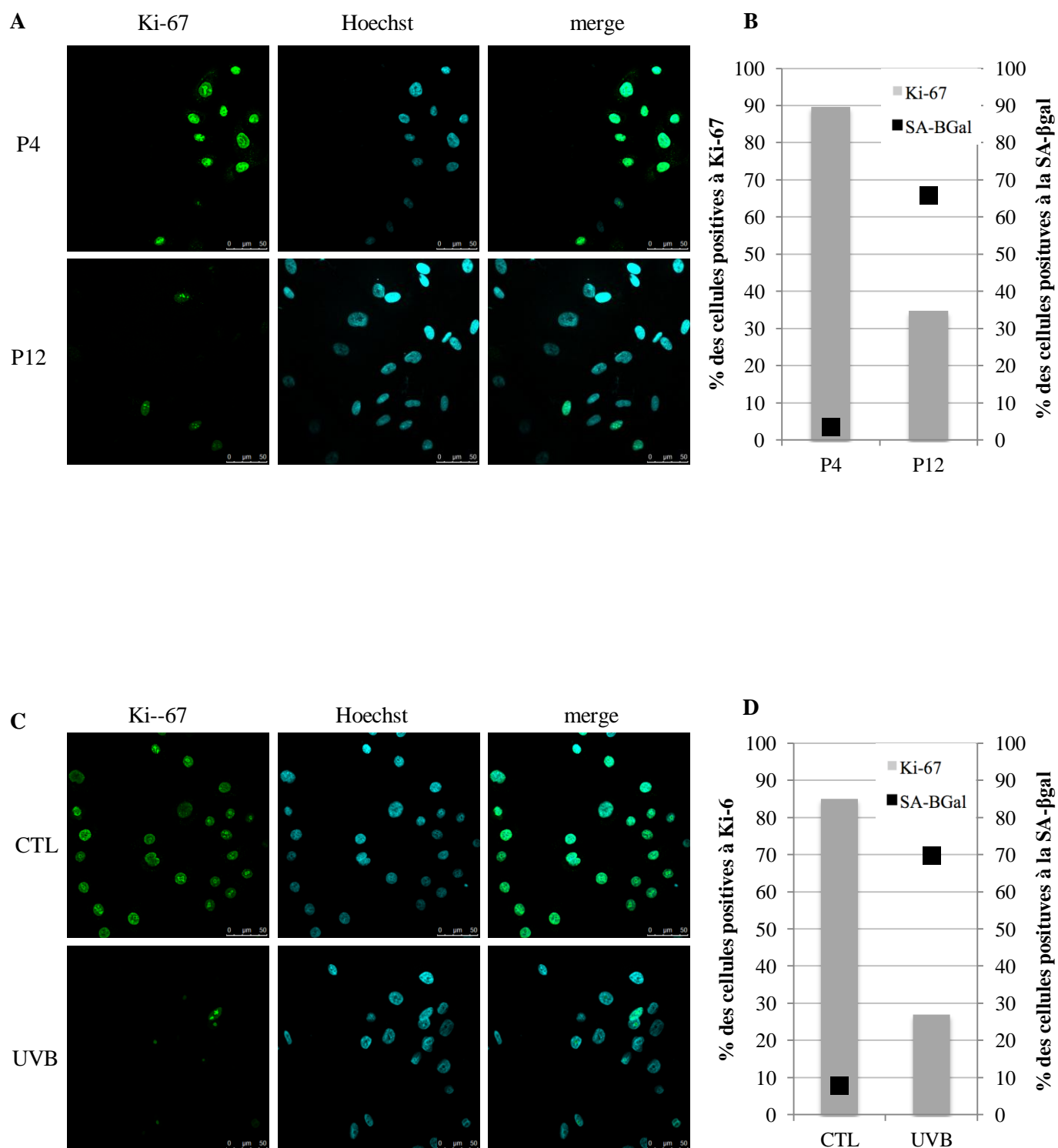


Figure III.7: Analyse par immunofluorescence de Ki-67 dans les kératinocytes (KC) en sénescence répliative (SR) ou en SIPS-UVB. Pour la SR, les KC sont observés à passage précoce (P4) ou tardif (P12). Pour la SIPS-UVB, les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les immunomarquages sont réalisés aux passages P4 et P12 pour la SR (A), et 72h après le dernier stress pour la SIPS-UVB (C). La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du Hoechst (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 50 µm. La quantification des cellules positives à Ki-67 a été comparée à la quantification des cellules positives à la SA-βgal pour la SR (B) et pour la SIPS-UVB (D).

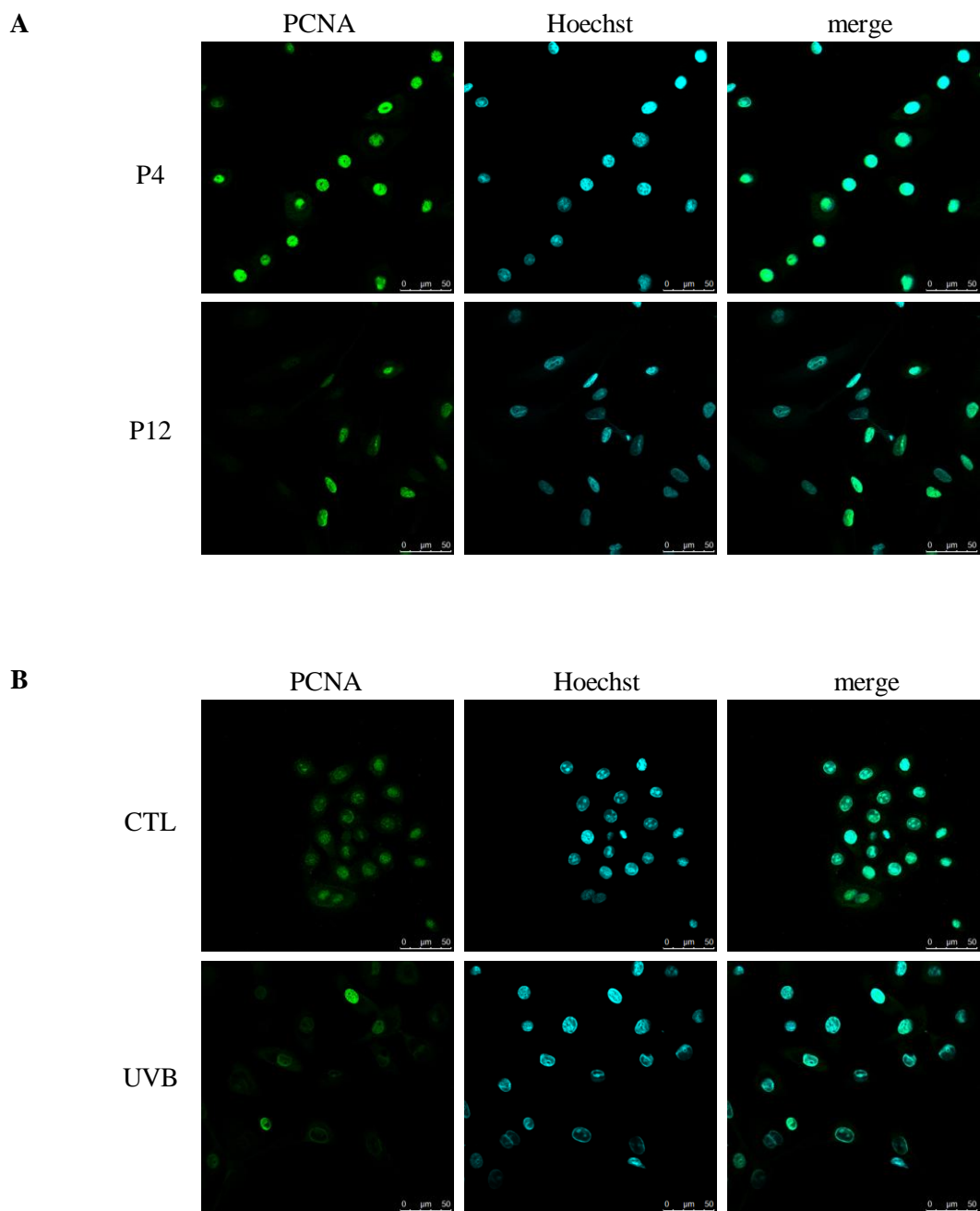


Figure III.8: Analyse par immunofluorescence de PCNA dans les kératinocytes (KC) en sénescence répliative (SR) ou en SIPS-UVB. Pour la SR, les KC sont observés à passage précoce (P4) ou tardif (P12). Pour la SIPS-UVB, les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les immunomarquages sont réalisés aux passages P4 et P12 pour la SR (**A**), et à 72h après le dernier stress pour la SIPS-UVB (**B**). La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du Hoechst (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 50 μm.

II. Dommages à l'ADN et activation de la voie DDR lors de la SIPS-UVB

Afin de déterminer par quelle(s) voie(s) de signalisation la sénescence induite par les UVB était activée et notamment l'arrêt du cycle cellulaire, nous nous sommes intéressés à deux types de dommages générés par les UVB et susceptibles d'activer des voies de signalisation: les dommages à l'ADN et les radicaux libres dérivés de l'oxygène (voir point III).

Les UVB induisent des dommages directs à l'ADN, comme les dimères de pyrimidines (CPDs et (6-4)PPs), ainsi que des dommages indirects dus à la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS), qui interagissent avec l'ADN (Pattison and Davies, 2006, Svobodova et al., 2006). L'exposition des cellules aux rayons UVB peut également mener à des cassures doubles brins (DSB). En présence de DSB, l'histone H₂AX est phosphorylée, facilitant l'assemblage de facteurs de points de contrôle et de réparation de l'ADN (Siddiqui et al., 2015).

1. Dommages à l'ADN détectés en SIPS-UVB

Afin d'étudier les dommages à l'ADN suite aux expositions UVB, nous avons réalisé des marquages des dimères de pyrimidine (CPDs et (6-4)PPs) en utilisant des anticorps spécifiques ainsi que des marquages de la forme phosphorylée d'H₂AX, révélatrice de cassures double brins.

Dans un premier temps, nous avons étudié la présence de ces dommages après une exposition unique à une dose élevée d'UVB (1000 mJ/cm²), sur des cellules jeunes (P6). Nous observons l'apparition de dommages de type CPDs 1h après le stress et une augmentation d'abondance de P-H₂AX à 6h après le stress. Les deux marquages s'intensifient à 6h puis diminuent à partir de 24h. Ceci indique donc que les kératinocytes sont capables de réparer leurs dommages à l'ADN après une seule exposition et que la réparation semble quasi complète à 48h (Figure III.9).

Nous avons ensuite analysé la présence de ces dommages après les trois expositions d'UVB induisant la SIPS. Les dommages ont été marqués à 24h, 48h et 72h après le dernier stress UVB.

Nous observons un marquage intense des noyaux suite au marquage des CPDs de 24 à 72h après le dernier stress UVB dans le KC stressés (Figure III.10.A).

La même observation est faite pour le marquage des (6-4)PPs mais le marquage est également cytoplasmique (Figure III.10.B).

En ce qui concerne les dimères de pyrimidine, on observe donc une persistance à long terme (jusqu'à 72h) de ces dommages, avec un nombre important de cellules marquées (plus de la moitié).

Pour le marquage de P-H₂AX, nous détectons quelques noyaux marqués dans les KC exposés aux UVB, encore observable à long terme (72h). La proportion de noyaux marqués est ici moins élevée que pour les dimères de pyrimidine (moins de 10 % de noyaux marqués contre plus de 50%) (Figure III.11.A). Ces résultats ont été confirmés par western blot, pour lequel on observe une augmentation de l'abondance de P-H₂AX à 24h, 48h et 72h après le dernier stress (Figure III.11.B).

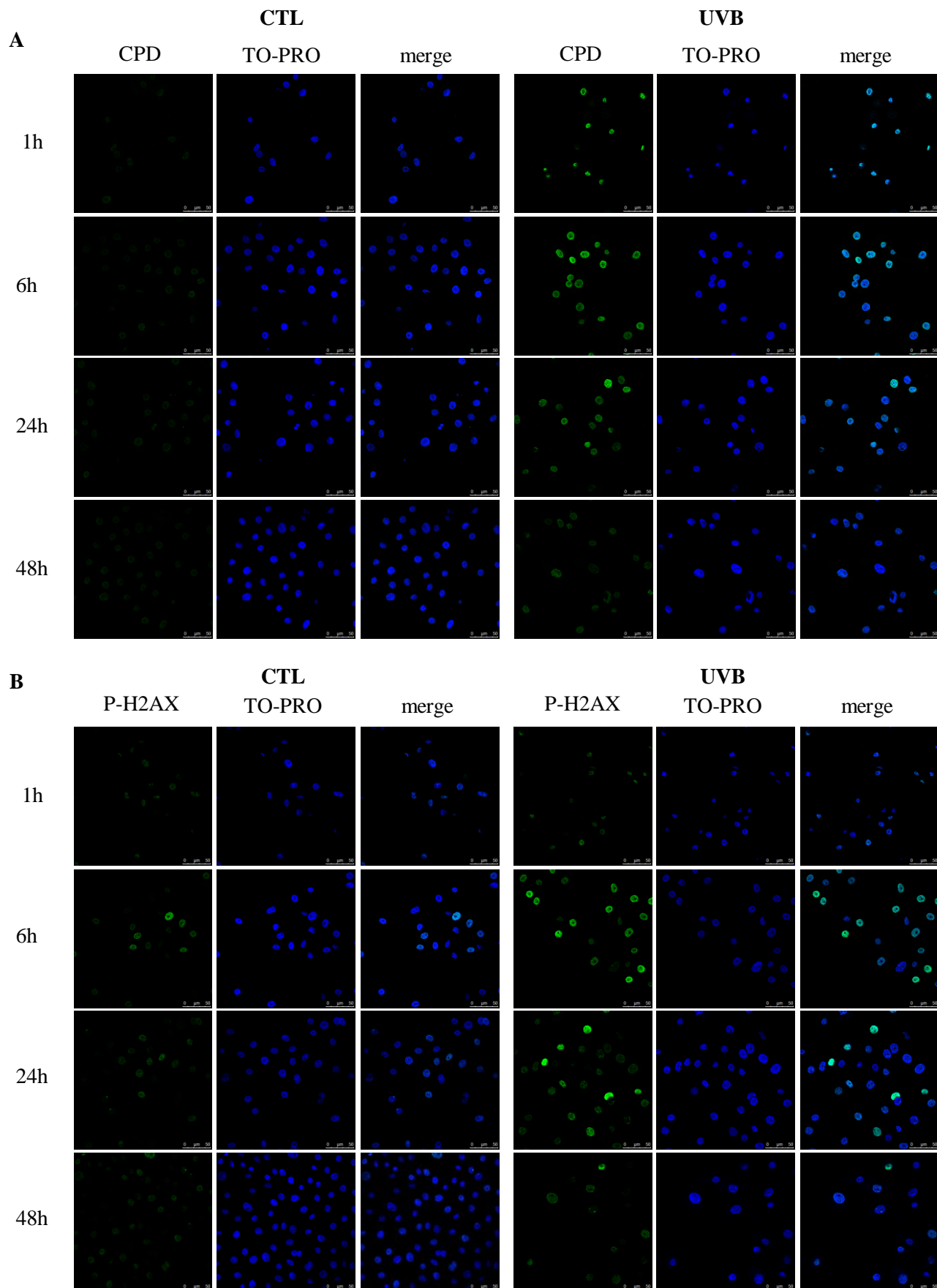


Figure III.9: Analyse par immunofluorescence des dommages à l'ADN dans les kératinocytes (KC) jeunes (P6) après une exposition unique d'UVB. Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à une exposition unique de 1 000 mJ/cm² d'UVB. Les immunomarquage sont réalisés à 1h, 6h, 24h et 48h après le dernier stress. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du TO-PRO (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 50 µm. **A.** Visualisation de P-H2AX, **B.** Visualisation des CPDs.

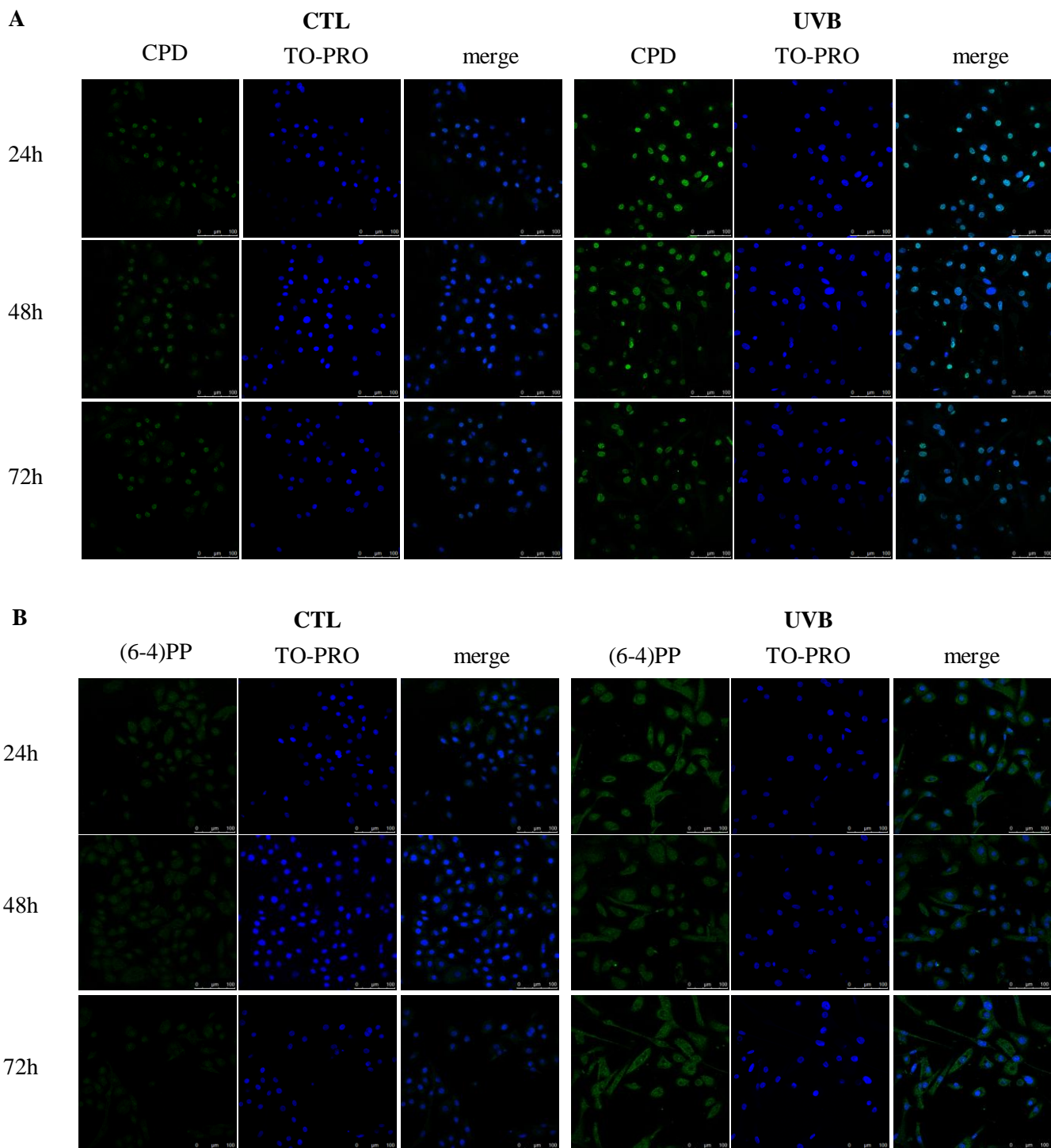


Figure III.10: Analyse par immunofluorescence des dommages à l'ADN dans les kératinocytes (KC) en UVB-SIPS. Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les immunomarquages sont réalisés à 24h, 48h et 72h après le dernier stress. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du TO-PRO (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 100 µm. **A.** Visualisation des CPDs, **B.** Visualisation des (6-4)PPs.

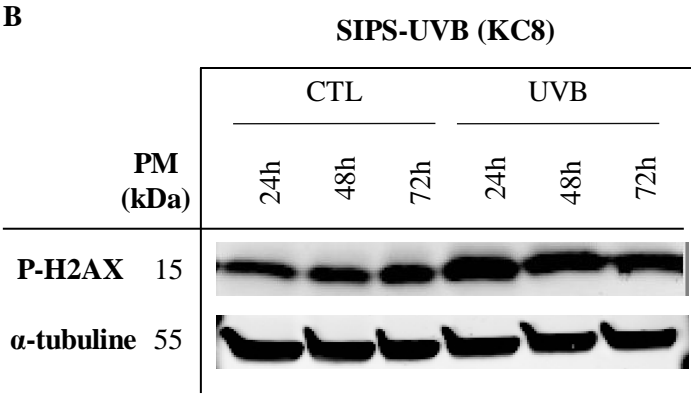
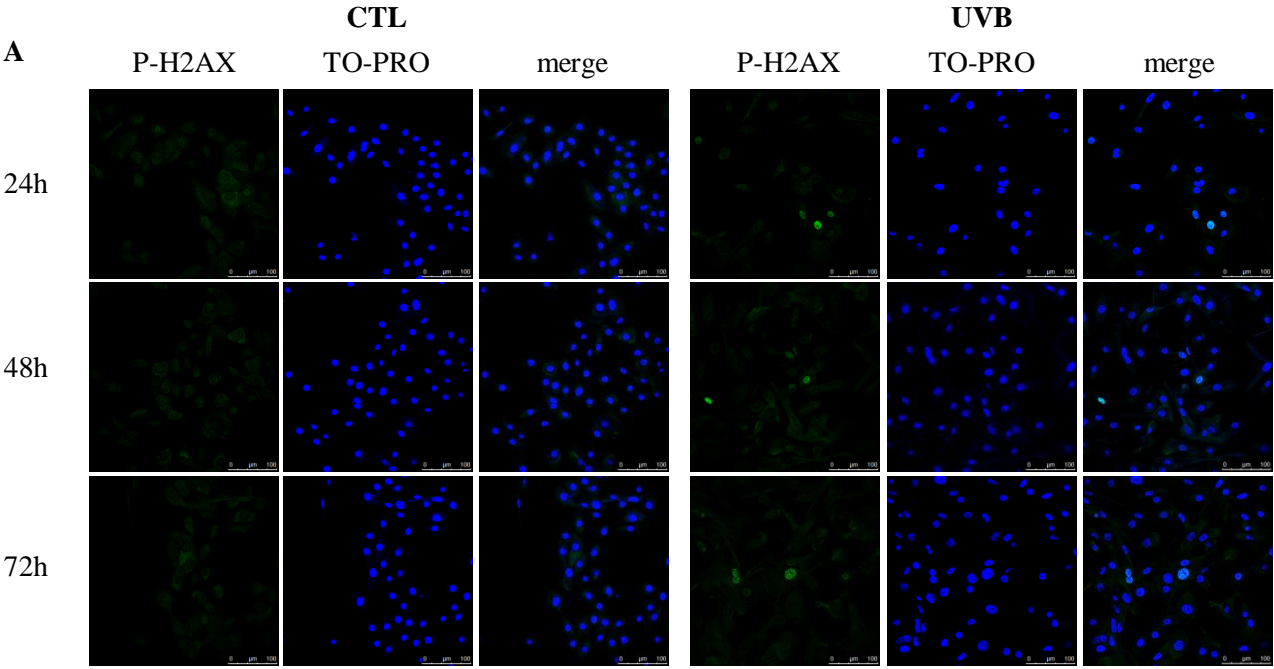


Figure III.11: Analyse par western blot et par immunofluorescence de P-H2AX dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB. Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. **A.** Les immunomarquages sont réalisés 24h, 48h ou 72h après le dernier stress. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du TO-PRO (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 100 μ m. **B.** Le western blot est réalisée avec un anticorps P-H2AX et l' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

Nous avons tenté de marquer les dommages oxydatifs à l'ADN et plus particulièrement la 8-oxo-desoxyguanosine (8-OHdG) mais les marquages n'ont pas fonctionné (pas de marquage dans les contrôles positifs à l' H_2O_2) ($n = 2$) (données non montrées). Notons que les mêmes marquages ont été réalisés à passage précoce (P6) et tardif (P12) mais aucun dommage n'a pu être mis en évidence (données non montrées).

La détection à long terme de ces dommages à l'ADN semblent démontrer que les systèmes de réparation ne permettent pas de les réparer complètement.

2. Etude de la voie DDR (DNA Damage Repair)

Etant donné la persistance des dommages à l'ADN à long terme en SIPS-UVB, l'activation de la voie de réparation des dommages à l'ADN (DDR) a été investiguée dans les kératinocytes normaux humains à différents temps après le dernier stress UVB induisant la SIPS.

La voie DDR s'active suite à la détection de dommages à l'ADN, par des complexes de reconnaissance, menant à l'activation de la kinase ataxia-telangiectasia (ATM) pour les cassures double brins ou de la kinase ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) pour les cassures simple brins. Ensuite, des protéines adaptatrices, dont breast cancer type-1 susceptibility (BRCA1) propagent le signal et activent, en aval, d'autres kinases nommées checkpoint kinases-1 (CHK1) et -2 (CHK2). Ces dernières transmettent le signal de la présence des dommages à des protéines effectrices telles que le facteur de transcription et suppresseur de tumeur p53 (Fumagalli et al., 2014, von Zglinicki et al., 2005), induisant un arrêt transitoire ou permanent (sénescence) du cycle cellulaire.

Suite à l'exposition des KC à 3 stress UVB induisant la SIPS, une cinétique a été réalisée de 0h (= juste après le dernier stress UVB) jusqu'à 72h après le dernier stress (cinétique de 0 à 24h ($n = 1$) et cinétique à 1h, 24h, 48h et 72h) par western blot et par immunomarquage (pour les temps 1h, 24h, 48h, 72h ; $n = 3$).

En ce qui concerne les temps courts (0 - 24h après le dernier stress aux UVB), les western blots des formes phosphorylées sont reprises en Figure III.12 et ceux des formes totales en Figure III.13. Les temps longs (24h-72h) sont présentés en Figure III.14 (formes phosphorylées) et en Figure III.15 (formes totale). Nous allons décrire les résultats en suivant l'ordre séquentiel d'activation de la voie DDR.

Pour ATM, une augmentation de la forme phosphorylée dans les conditions UVB comparées aux conditions contrôles est observée jusqu'à 24h après le dernier stress UVB. Aucune différence d'abondance n'est par contre observée pour la forme totale de ATM.

Pour ATR, le signal pour la forme phosphorylée est faible, rendant l'analyse difficile à interpréter. Cependant, on peut observer une légère diminution de la forme phosphorylée dans les conditions UVB, en comparaison aux CTL, à partir de 17h jusqu'à 72h après le dernier stress aux UVB. La forme totale d'ATR semble présenter une légère diminution dans les conditions UVB en comparaison avec les CTL de 24h à 72h.

Les résultats obtenus pour la forme phosphorylée de BRCA1, en cinétique aux temps courts, présentent une diminution d'abondance dans les conditions UVB en comparaison aux CTL à 2h et 4h après le dernier stress UVB. Son abondance diminue fortement dans les deux conditions à 72h.

La forme totale de BRCA1 présente une diminution d'abondance en conditions de SIPS-UVB, en comparaison avec les CTL, observable directement et jusqu'à 48h après le stress UVB.

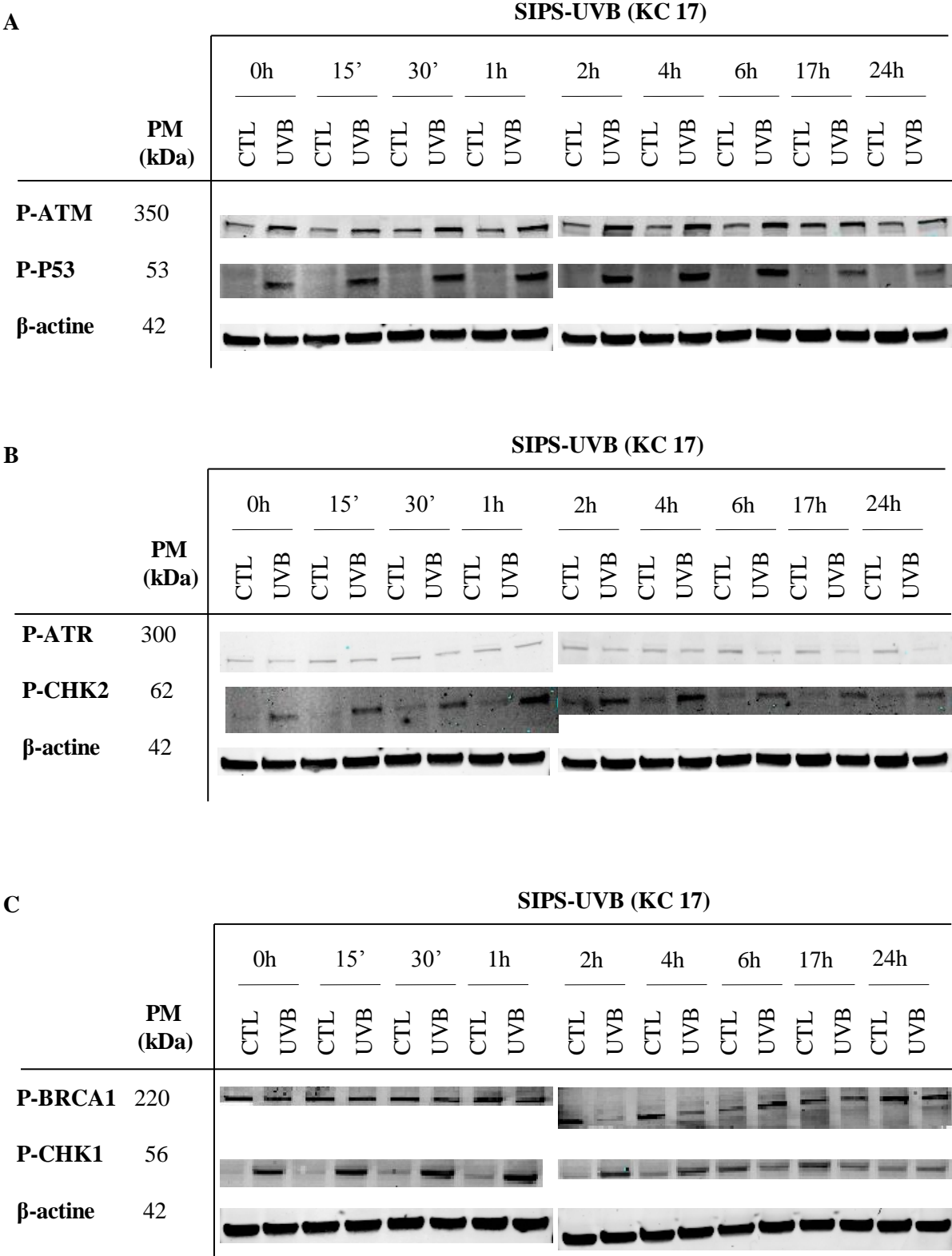


Figure III.12: Analyse par western blot de la voie DDR dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB . Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les Western Blot sont réalisés pour les temps 0h, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 17h et 24h (n = 1). La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge. **A.** Abondance de P-ATM et P-p53, **B.** Abondance de P-ATR et P-CHK2, **C.** Abondance de P-BRCA1 et P-CHK1.

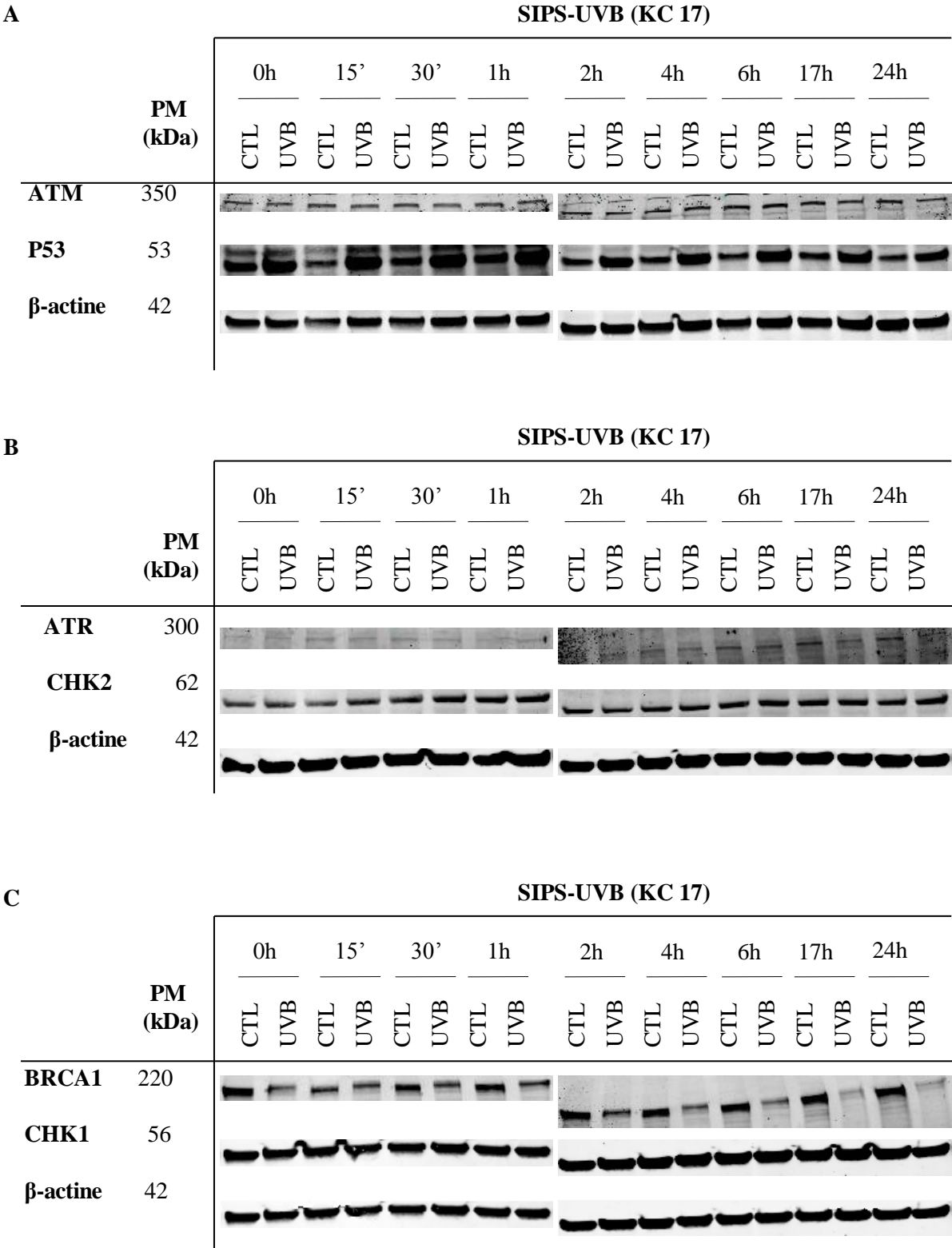


Figure III.13: Analyse par western blot de la voie DDR dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB . Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les Western Blot sont réalisés pour les temps 0h, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 17h et 24h (n = 1). La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge. **A.** Abondance de ATM et p53 , **B.** Abondance de ATR et CHK2, **C.** Abondance de BRCA1 et CHK1.

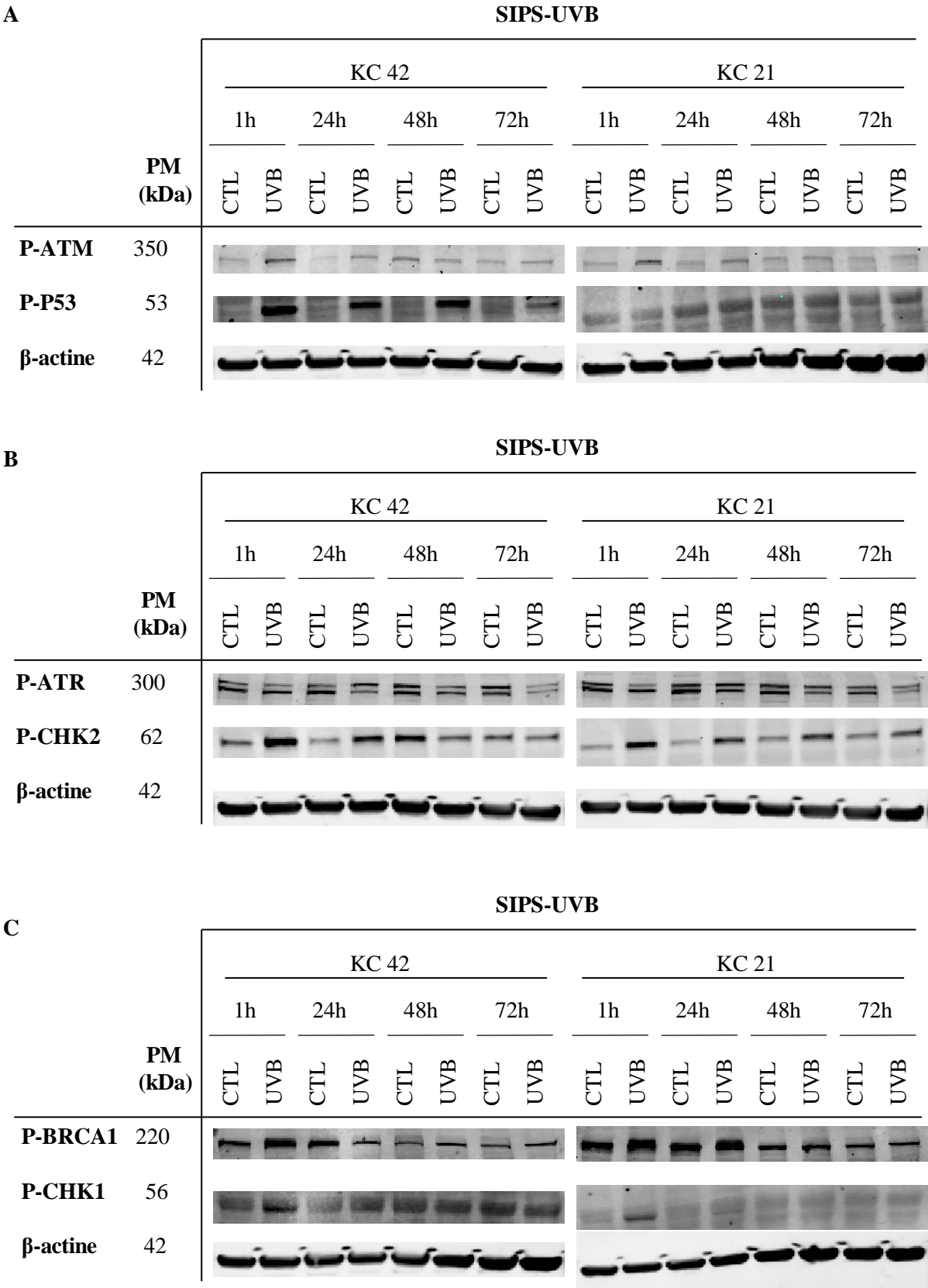


Figure III.14: Analyse par western blot de la voie DDR dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB . Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les Western Blot sont réalisés pour les temps 1h, 24h, 48h et 72h (n = 2). La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge. **A.** Abondance de P-ATM et P-p53 , **B.** Abondance de P-ATR et P-CHK2, **C.** Abondance de P-BRCA1 et P-CHK1.

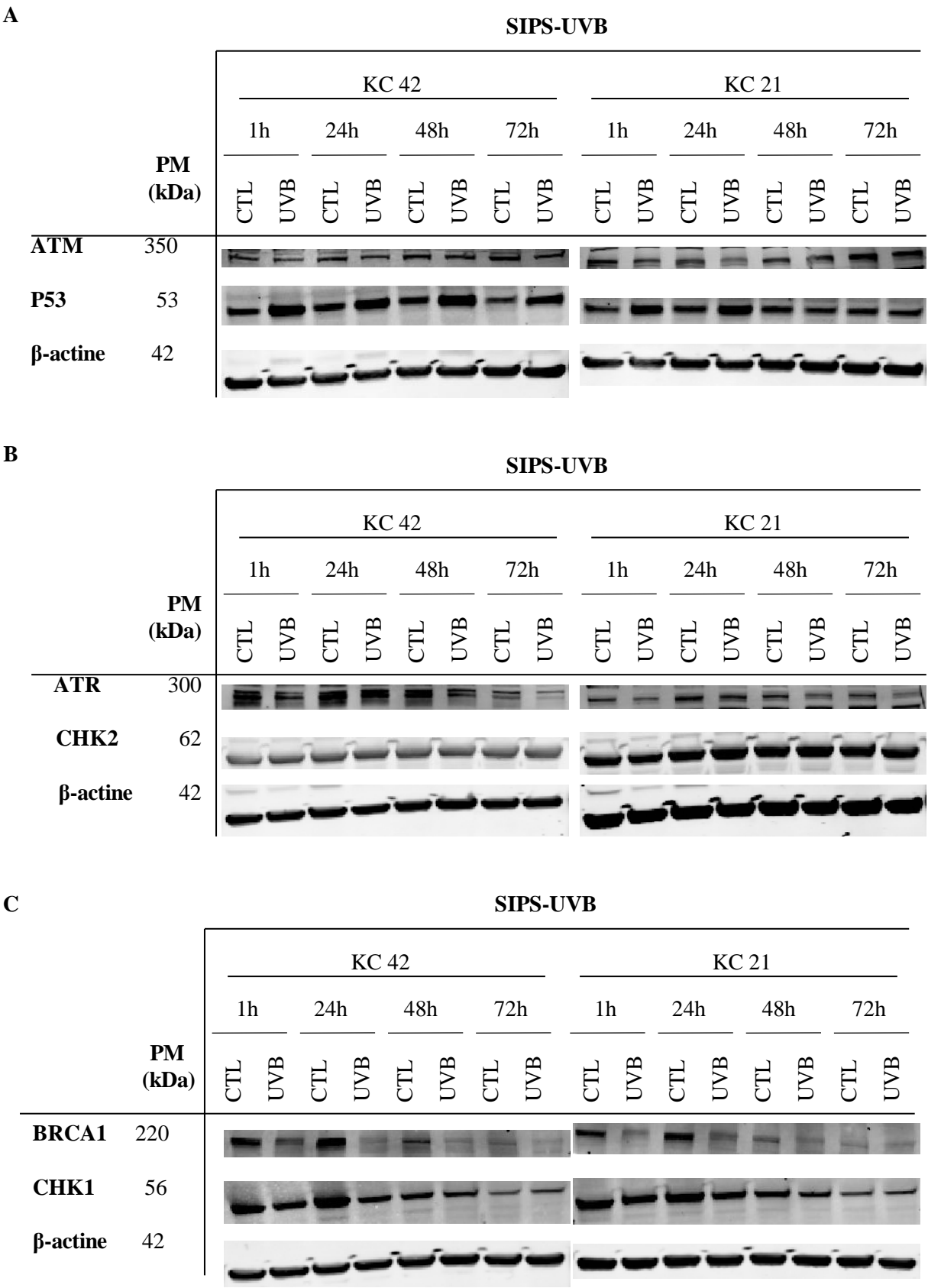


Figure III.15: Analyse par western blot de la voie DDR dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB . Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les Western Blot sont réalisés pour les temps 1h, 24h, 48h et 72h (n = 2). La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge. **A.** Abondance des protéines ATM et p53, **B.** Abondance des protéines ATR et CHK2, **C.** Abondance des protéines BRCA1 et CHK1.

Pour CHK1, une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée est observée pour les conditions UVB en comparaison aux conditions contrôles, jusqu'à 4h après le dernier stress. P-CHK1 semble par la suite moins abondante dans les conditions de SIPS-UVB en comparaison aux conditions contrôles, durant les temps 6h et 17h, puis présente une abondance similaire dans les temps plus tardifs. Pour l'abondance de la forme totale de CHK1, une diminution d'expression est observable à partir de 48h dans les deux conditions.

Pour CHK2, l'abondance de la forme phosphorylée est plus élevée en conditions UVB, directement et jusqu'à 24h (KC42) ou 72h (KC21) après le dernier stress UVB. Pour la forme totale, aucune différence n'est observée entre les conditions UVB et CTL.

Enfin, pour p53, une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée est observée en conditions UVB, directement et jusqu'à 24h (KC17) ou 72h (KC42) après le dernier stress UVB. Cette augmentation d'abondance est également détectée pour la forme totale de p53, directement et jusqu'à 24h (KC21) ou 72h (KC42) après le dernier stress UVB.

L'étude par western blot de l'activation de la voie de DDR chez des kératinocytes en SIPS-UVB a été complétée par un marquage en immunofluorescence des formes phosphorylées de ATM, ATR, BRCA1, CHK1, CHK2 et p53, aux temps 1h, 24h, 48h et 72h après le dernier stress UVB (Figure III.16 à Figure III.18).

Le marquage nucléaire de P-ATM, bien que faible, augmente de façon transitoire dans les conditions UVB-SIPS à 24h après le dernier stress UVB (on peut également remarquer un léger marquage à 48h).

En ce qui concerne P-ATR, un marquage nucléaire est observable en conditions CTL, aussi bien qu'en conditions UVB. Cependant, ce marquage est plus intense en conditions UVB, particulièrement de 1h jusqu'à 48h après les stress UVB.

Le marquage de P-BRCA1, bien qu'également présent au niveau des noyaux des cellules contrôles, est plus intense chez les cellules soumises aux UVB, pour les temps 1h et 24h après le dernier stress. Ce marquage diminue progressivement pour disparaître au temps 72h après le dernier stress dans les cellules exposés aux UVB.

Le marquage nucléaire de P-CHK1 est également plus intense en condition UVB dans les temps 1h et 24h, et s'estompe dans les temps plus longs.

On observe l'augmentation d'abondance de P-CHK2 de 1h à 72h après les stress, alors que celui-ci n'est pas ou peu observé en conditions contrôles.

Un marquage nucléaire intense de P-p53 est également observé de manière persistante jusqu'à 72h après le dernier stress aux UVB, et est absent des conditions contrôles.

Un tableau récapitulatif de l'activation des différents partenaires de la DDR est repris en Table III.2.

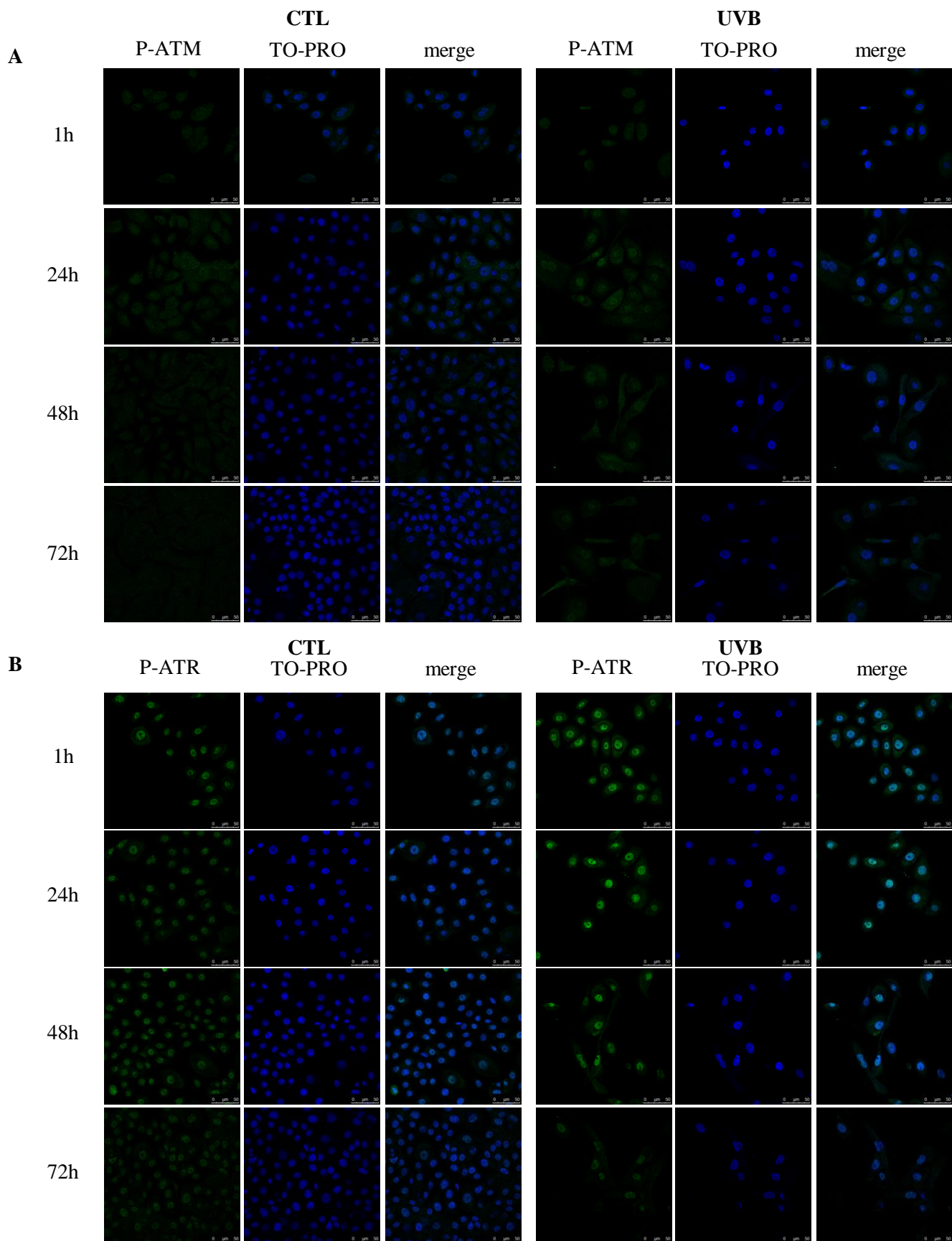


Figure III.16: Visualisation des protéines associées à la voie DDR dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB. Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm^2 espacés de trois heures. Les immunomarquages sont réalisés à 1h, 24h, 48h, 72h après le dernier stress. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du TO-PRO (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : $50 \mu\text{m}$ ($n = 2$). **A.** Visualisation de P-ATM **B.** Visualisation de P-ATR.

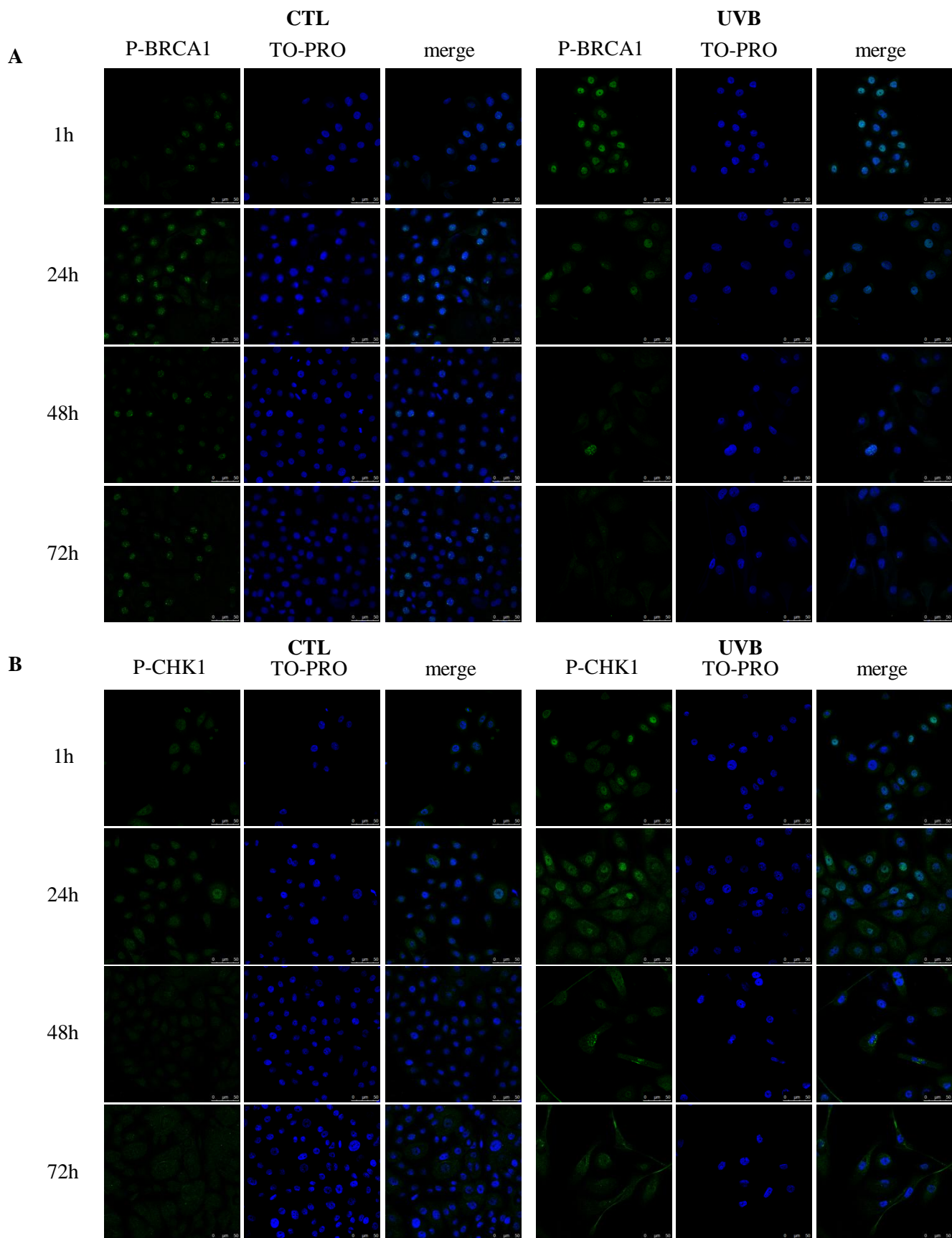


Figure III.17: Visualisation des protéines associées à la voie DDR dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB. Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les immunomarquages sont réalisés à 1h, 24h, 48h, 72h après le dernier stress. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du TO-PRO (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 50 µm (n = 2). **A.** Visualisation de P-BRCA1, **B.** Visualisation de P-CHK1.

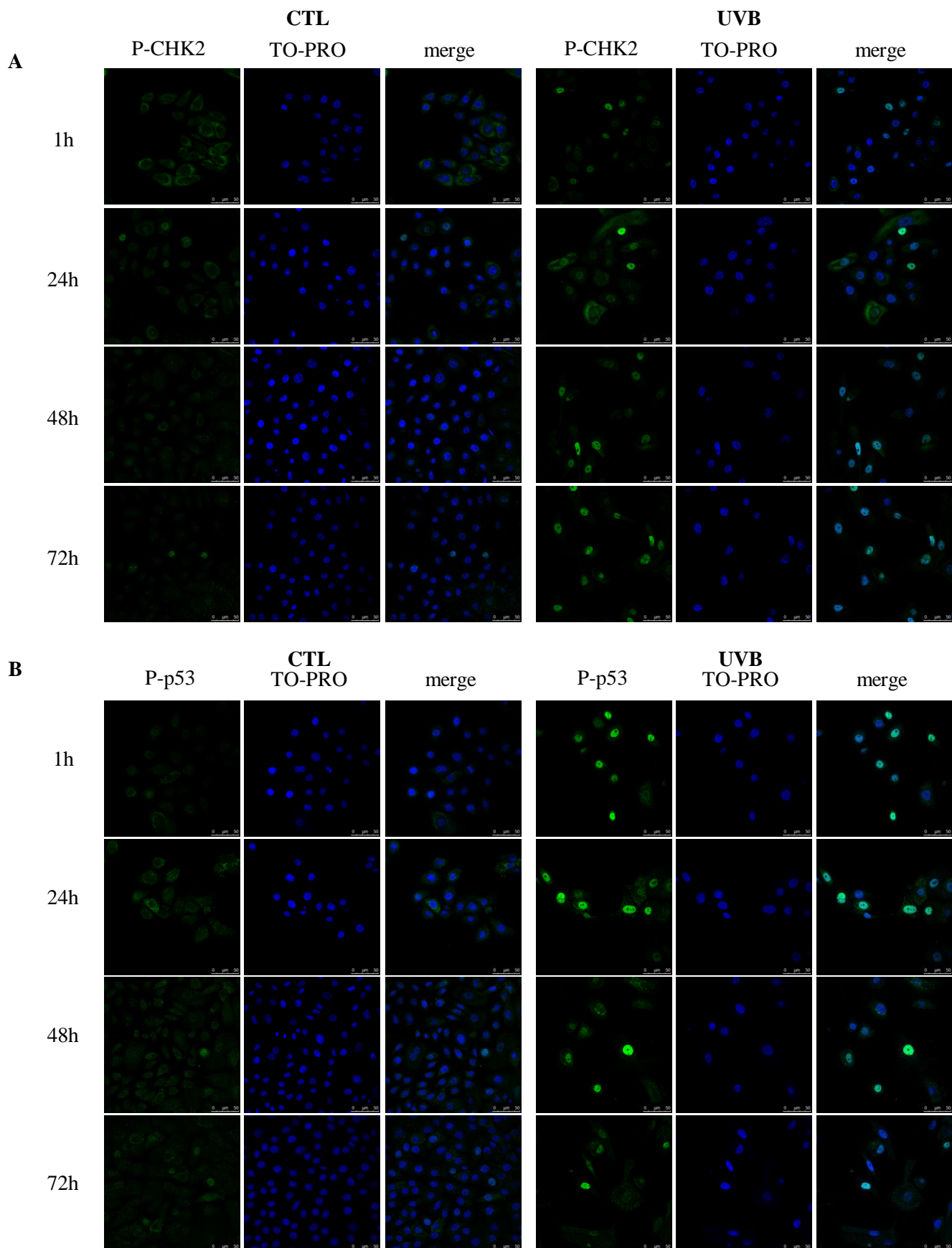


Figure III.18: Visualisation des protéines associées à la voie DDR dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB. Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les immunomarquages sont réalisés à 1h, 24h, 48h, 72h après le dernier stress. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du TO-PRO (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 50 µm (n = 2). **A.** Visualisation de P-CHK2, **B.** Visualisation de P-p53.

	formes phosphorylées		formes totales
	WB	IF	WB
ATM	↗ (0h - 24h)	↗ (1h - 24h)	-
ATR	↘ (17h - 72h)	↗ (1h - 48h)	↘ (24h - 72h)
BRCA1	↘ (2h - 4h)	↗ (1h - 24h) ↘ (48h - 72h)	↘ (0h - 48h)
CHK1	↗ (0h - 4h) ↘ (6h - 17h)	↗ (1h - 24h)	-
CHK2	↗ (0h - 72h)	↗ (1h - 72h)	-
p53	↗ (0h - 72h)	↗ (1h - 72h)	↗ (0h - 72h)

Table III.2: Tableau reprenant les résultats, pour les différents partenaire de la voie DDR, obtenus par western blot et immunofluorescence dans les kératinocytes en SIPS-UVB en comparaison avec les contrôles.

3. Détection des ROS

Les UVB sont capables d'induire la production des ROS via l'excitation de molécules photosensibilisantes.

La production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) a été analysée chez les kératinocytes en SIPS-UVB par cytométrie en flux (FACS), à l'aide de la sonde CM-H₂DCF (n = 2) (Figure III.19). La sonde, non fluorescente au départ, est oxydée en présence de ROS et devient fluorescente.

En plus des conditions CTL et SIPS-UVB, des contrôles négatif et positif ont été préparés. Le contrôle négatif consiste en des cellules non incubées avec la sonde. Le contrôle positif consiste en des cellules mises en contact avec la sonde et avec du SIN-1 Hydrochloride, libérant de l'acide nitrique en solution.

Le graphe de la Figure III.19 montre les courbes de fluorescence détectées pour chaque condition. Les courbes des contrôles négatif et positif se trouvent respectivement à l'extrême gauche et à l'extrême droite du graphique. On observe un déplacement vers la droite du signal de fluorescence pour la condition SIPS-UVB (en gris), en comparaison avec la condition contrôle (en noir). Ceci indique une augmentation du signal de fluorescence émis par les cellules en conditions UVB. Ces résultats suggèrent une augmentation de la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) en SIPS-UVB.

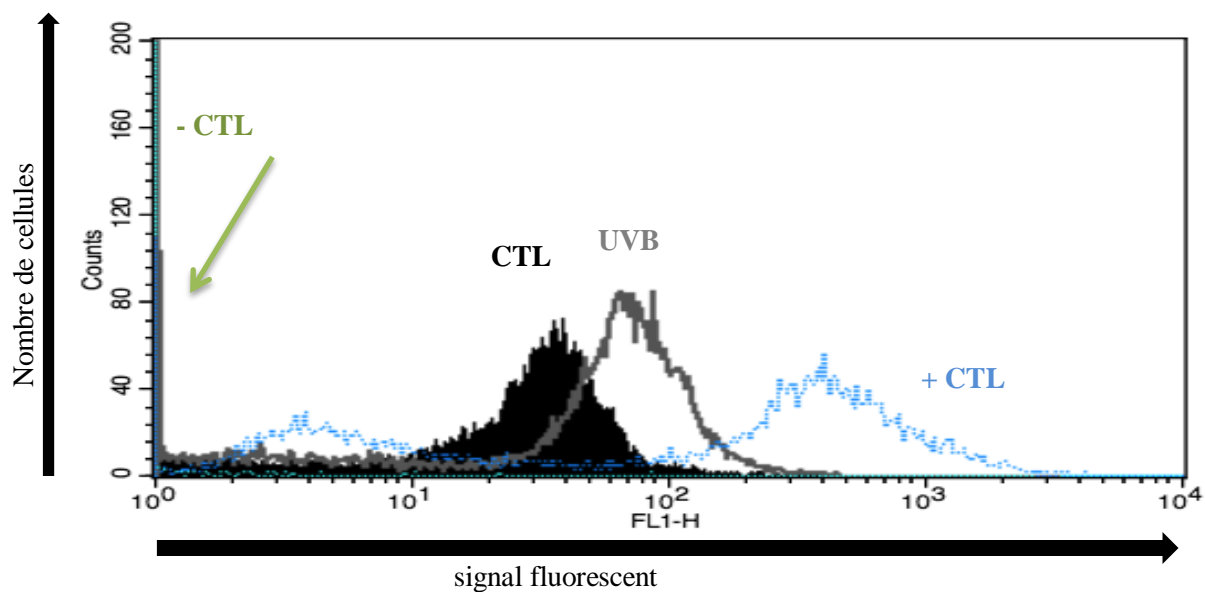
Les ROS sont capables d'induire l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont l'activation du facteur de transcription Nrf2.

Nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence du facteur de transcription Nrf2, à 1h, 24h, 48h ou 72h après le dernier stress aux UVB (n = 2) (Figure III.20).

En conditions normales, ce facteur de transcription est synthétisé, séquestré dans le cytoplasme et dégradé de manière continue. Lors de stress oxydatifs, Nrf2 est relâché, phosphorylé et transloque dans le noyau, où il active la transcription de gènes nécessaires à la réponse aux stress oxydatifs, portant la séquence consensus ARE (antioxydant response element) dans leurs promoteur (Hayes et al., 2010).

Nous observons, en conditions CTL, un marquage nucléaire et cytoplasmique au temps 1h et cytoplasmique pour les temps 24h, 48h et 72h. Pour les conditions UVB, aucune différence n'est observée par rapport aux conditions CTL au temps 1h. Par contre, un marquage nucléaire intense est observé dans les conditions UVB à 24h. L'expression de Nrf2 est maintenue jusqu'à 72h avec une localisation nucléaire et cytoplasmique.

La translocation de Nrf2 vers les noyaux a donc pu être visualisée chez les kératinocytes en SIPS-UVB, ce qui laisse donc supposer que cette voie est également activée après le stress UVB.



Key	Name	Parameter	Gate
■	KC17SIPS-UV.008	FL1-H	No Gate
—	KC17SIPS+UV.007	FL1-H	No Gate
.....	KC17SIPS-ctl-.006	FL1-H	No Gate
.....	KC17SIPS-ctl+.005	FL1-H	No Gate

Figure III.19: Visualisation de la production de ROS dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB. Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 675 mJ/cm² d'UVB trois fois par jour à intervalle de trois heures. Les KC sont incubés avec la sonde CM-H₂DCF 72h après le dernier stress. Les cellules contrôles sont visibles en noir, les cellules UVB en gris, le contrôle négatif (cellules non incubées avec la sonde) en turquoise (contre l'axe des ordonnées) et le contrôle positif (cellules mises en contact avec la sonde et avec du SIN-1 Hydrochloride) en bleu.

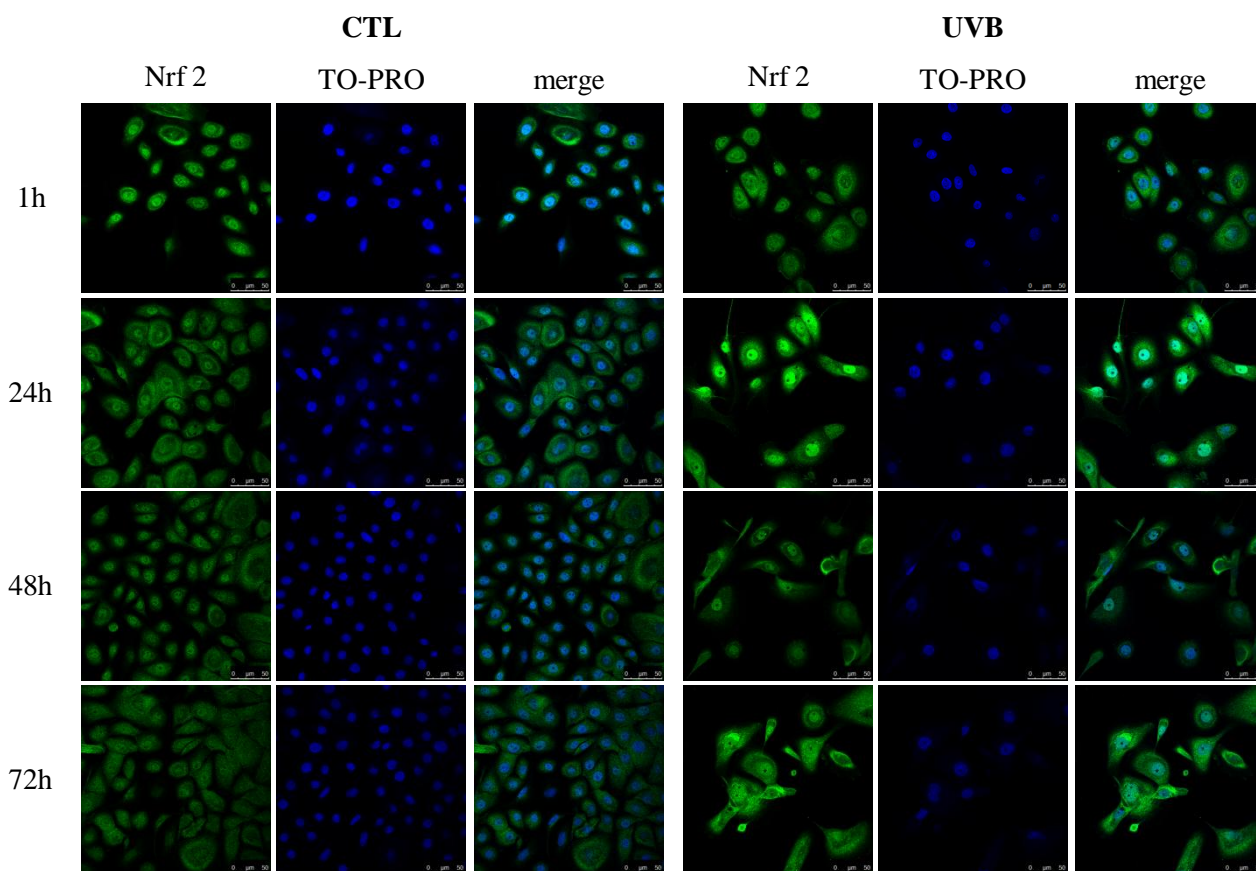


Figure III.20: Analyse par immunofluorescence de Nrf2 dans les kératinocytes (KC) en SIPS-UVB . Les KC sont exposés (ou non exposés: CTL) à 3 stress UVB de 675 mJ/cm² espacés de trois heures. Les immunomarquage sont réalisés à 1h, 24h, 48h ou 72h après le dernier stress. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du TO-PRO (bleu). La visualisation a été faite par microscopie confocale (Leica, Allemagne). Échelle : 50 µm.

DISCUSSION, CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'objectif de ce mémoire était d'investiguer les voies de signalisation impliquées dans l'apparition de la sénescence induite par les UVB.

Ce travail a débuté par l'étude de différents biomarqueurs de la sénescence chez les kératinocytes normaux en SR et en SIPS-UVB. Dans un second temps, suite à l'observation de dommages permanents à l'ADN induit par la SIPS-UVB, l'analyse de la voie DDR pouvant être impliquée dans l'apparition du phénotype sénescence a été investigué ainsi que la formation de ROS et la translocation nucléaire de Nrf2.

Afin de pouvoir caractériser la sénescence (SR et SIPS-UVB) au sein des kératinocytes, différents biomarqueurs de la sénescence, décrits pour le fibroblaste, ont été étudiés. Les biomarqueurs étudiés sont : le changement de morphologie cellulaire, le pourcentage de cellules positives à l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal), les changements d'expression de gènes associés à la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire.

Parmi ces différents biomarqueurs, le changement de morphologie des cellules sénescence est facilement et rapidement observable par microscopie photonique. Les résultats obtenus durant ce mémoire montrent, chez les kératinocytes en SR et en SIPS-UVB, une modification de la morphologie cellulaire qui apparaît élargie et irrégulière, en comparaison avec les cellules en passage précoce ou les cellules CTL. Les résultats sont en accord avec la littérature. En effet, il est décrit par Soroka et *al.*, que les kératinocytes jeunes présentent une morphologie régulière et polygonale (10-20 μ m de diamètre). En comparaison, la morphologie des kératinocytes sénescence devient irrégulière et s'agrandit jusqu'à atteindre 50 μ m de diamètre (Soroka et *al.*, 2008). Cette augmentation de taille peut être expliquée par le fait que les kératinocytes sénescence présentent une augmentation du nombre de vacuoles lysosomiales. En effet des altérations de macromolécules intracellulaires s'accumulent lors de la sénescence, ce qui a comme conséquence d'induire une biogénèse élevée de lysosomes primaires (Kurz et *al.*, 2000).

L'augmentation du nombre de lysosomes permet également de détecter l'activité de l'enzyme lysosomiale β galactosidase à un pH suboptimal de pH 6,0 (SA- β gal). Ce phénomène est à la base de l'augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité de la SA- β gal dans les cultures sénescence, décrite comme un biomarqueurs classique de la sénescence (Debacq-Chainiaux et *al.*, 2009, Dimri et *al.*, 1995). Dans notre étude, le pourcentage de cellules positives pour l'activité de la SA- β gal dans des cultures de kératinocytes en SR et en SIPS-UVB augmente largement. Ce biomarqueurs permet donc de déterminer de façon rapide et aisée le pourcentage de cellules sénescence au sein d'une population. Les cultures cellulaires étant composées de populations hétérogènes, où on trouve des cellules prolifératives et sénescence, ce marqueur quantifiable est hautement informatif.

Les modifications de l'expression de gènes associés à la sénescence ont été investiguées en SR et en SIPS-UVB. En effet, des changements d'expression ont été décrits dans la littérature pour des gènes intervenant dans différents aspects de la sénescence chez les fibroblastes du derme et les kératinocytes normaux oraux (Gonos et *al.*, 1998, Kang et *al.*, 2003). Parmi ces gènes, on peut citer ceux impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (p16^{INK4A} et p21^{WAF-1}), dans la survie cellulaire (apoptoprotéine J) ou dans la composition et la biogénèse de la matrice extracellulaire (fibronectine 1 et MMP9) (Dumont et *al.*, 2000, Gonos et *al.*, 1998, Kang et *al.*, 2003, Toussaint et *al.*, 2000). Les résultats obtenus durant ce mémoire pour la SR et la SIPS-UVB chez le kératinocyte épidermique, montrent une surexpression de ces cinq gènes dans les deux conditions de sénescence, en comparaison avec leur contrôle respectif. Cependant, la variation entre les différents donneurs est élevée, expliquant l'obtention d'écart-types importants, et un manque de significativité statistique des résultats. En effet, les kératinocytes

utilisés durant ce mémoire sont des cultures primaires provenant de biopsies de peaux. Bien que l'expression des gènes étudiés ait tendance à augmenter, il n'est pas encore possible de tirer des conclusions définitives. Pour ce faire, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de donneurs afin de mieux représenter les modulations de l'expression génique au sein des kératinocytes sénescents (SR et SIPS-UVB). En effet, en augmentant le nombre de réplicats biologique, il serait peut être possible de confirmer les tendances observées sur ces lignées primaires en renforçant les résultats statistiques.

L'expression de p16^{INK4A} et p21^{WAF-1} a été étudiée au niveau de leur expression génique. Ces inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines (CDKI) sont, impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. Afin d'investiguer l'arrêt irréversible du cycle cellulaire caractérisant les cellules sénescences, nous avons donc analysé l'abondance protéique (par western blot et immunofluorescence) de ces deux acteurs, ainsi que des marqueurs de prolifération, Ki-67 et PCNA (uniquement en immunofluorescence). En conditions de SR, les résultats montrent une augmentation de l'abondance de p16^{INK4A} alors que p21^{WAF-1} diminue en comparaison avec les cellules en passage précoce. De façon attendue, l'abondance des protéines Ki-67 et PCNA diminue. Pour les conditions de SIPS-UVB, les résultats obtenus montrent une augmentation de l'abondance de p21^{WAF-1} après le dernier stress UVB. Ceci semble démontrer que l'arrêt de prolifération ne dépend pas des mêmes voies en SR et en SIPS-UVB.

En ce qui concerne les marqueurs de prolifération, les résultats montrent une diminution d'abondance de Ki-67 et PCNA dans les deux modèles de sénescence. Ces résultats sont en cohérence avec la littérature sur l'arrêt du cycle cellulaire lié à la sénescence, qui suggère en SR une augmentation de p16^{INK4A}, dans les temps tardif en SR (Minty et al., 2008) et une diminution de p21^{WAF-1} (Kang et al., 2003). Alors que p21^{WAF-1} est augmenté en SIPS-UVB.

Nos résultats concernant p21^{WAF-1} en SR, montrent une diminution de l'abondance de la protéine, alors que l'abondance d'ARNm est augmentée en passage P12. La diminution de p21^{WAF-1} a été observée par d'autres recherches portant sur la sénescence répllicative des kératinocytes normaux oraux (Kang et al., 2003, Min et al., 1999). Au cours de ces recherches, les auteurs observent que l'expression du gène codant pour p21^{WAF-1} est réprimée et que l'abondance de la protéine est également diminuée durant la sénescence répllicative, ce qui confirme nos données au niveau protéique.

En conclusion, l'arrêt irréversible du cycle cellulaire chez les kératinocytes sénescents semble donc passer principalement par la voie de p16^{INK4A} en ce qui concerne la SR.

Ces résultats indiquent une différence marquante entre la sénescence des fibroblastes normaux humains et les kératinocytes normaux humains, soulignant l'importance de caractériser et d'investiguer la sénescence sur différents types cellulaires. Les résultats montrent également des différences entre la SR et la SIPS-UVB chez les kératinocytes, étant donné que la voie p21^{WAF-1} semble quant à elle activée en SIPS-UVB.

Pour conclure, nous avons caractérisé la sénescence du kératinocyte dans les deux modèles de sénescence par l'étude des biomarqueurs de sénescence, et montré que les deux modèles utilisés durant ce mémoire induisent la sénescence au sein de kératinocytes normaux humains. De plus, cela nous a permis de confirmer des différences observées entre la sénescence des kératinocytes et celles des fibroblastes, en ce qui concerne les voies d'arrêt du cycle cellulaire. Ceci montre l'intérêt d'étudier la sénescence dans différents types cellulaires.

Dans un second temps, les voies de signalisation impliquées dans l'apparition prématurée de la sénescence induite par les UVB chez les kératinocytes ont été investiguées. Afin de pouvoir

déterminer quelles voies de signalisation sont impliquées dans l'apparition prématurée de la sénescence induite par les UVB chez les kératinocytes, nous avons choisi d'analyser la présence des dommages à l'ADN générés et l'activation de la voie DDR, et d'analyser la production de ROS et l'activation de facteur de transcription Nrf2.

Les UVB induisent des dommages directs ou indirects (via la formation de ROS) à l'ADN. Les dommages directs à l'ADN se présentent principalement sous forme de dimères de pyrimidine (CPDs et (6-4)PPs) ce qui peut mener à l'apparition de cassures doubles brins (DSB) (Kim et al., 2014). La perception des cassures doubles brin, mène rapidement à la phosphorylation de l'histone H2AX par les kinases ATM et ATR. Cette phosphorylation a d'ailleurs été proposée comme marqueur moléculaire pour visualiser des dommages à l'ADN (Siddiqui et al., 2015).

Durant ce travail, nous avons étudié la présence de dommages à l'ADN persistants dans en SIPS-UVB dans les kératinocytes, via un marquage en immunofluorescence des dommages directs à l'ADN (CPDs et (6-4)PPs) ainsi que par l'analyse par marquage en IF et par WB de l'abondance de la forme phosphorylée de H2AX (P-H2AX), renseignant sur l'existence des cassures double brins dans l'ADN.

Après une exposition unique à une dose élevée d'UVB (1000 mJ/cm^2), les dommages directs à l'ADN (CPDs et (6-4)PPs) induits sont éliminés à partir de 48h après ce stress. Ces observations ont été aussi bien réalisées sur des cellules aux passages précoces et tardifs. Elles ne montrent donc aucune différence entre les deux passages. Ce résultat indique que la machinerie de réparation de l'ADN a permis de rétablir l'intégrité de l'ADN à 48h après le stress. Par contre, après une exposition chronique aux UVB (trois exposition aux UVB de 675 mJ/cm^2) on constate que les dommages persistent à 72h après le derniers stress.

L'apparition de dommages à l'ADN induit l'arrêt du cycle cellulaire transitoire ou permanent afin de permettre une réparation des dommages par les cellules (Lambrus et al., 2015). Cet arrêt du cycle cellulaire se fait via l'activation de la voie de réparation des dommages à l'ADN (DDR) dont l'activation persistante a été associée à la sénescence (d'Adda di Fagagna, 2008).

Etant donné la présence de dommages à l'ADN persistants après 72h après le derniers stress, en SIPS-UVB, l'activation de la voie de réparation des dommages à l'ADN (DDR) a été investiguée, par western blot et immunofluorescence, dans les kératinocytes en SIPS-UVB, dans une cinétique démarrant à l'arrêt du stress jusqu'à 72h après le dernier stress UVB.

Les résultats obtenus montrent, pour les kinases activées en amont de la voie, ATM et ATR, une phosphorylation rapide à partir d'1h jusqu'à 24h pour ATM, et jusqu'à 48h pour ATR (en immunofluorescence), qui s'estompe aux temps plus longs. Pour la protéine adaptatrice BRCA1, une augmentation de la forme phosphorylée est observée à 1h après le dernier stress, celle-ci diminue ensuite pour les temps 24h, 48h et 72h à un niveau semblable à celui des cellules contrôles. Pour les kinases, activées en aval de la voie, CHK1 est phosphorylée de 0 à 6h, avant de diminuer. En revanche, CHK2 montre une phosphorylation de manière persistante jusqu'à 72h. Finalement la protéine effectrice p53 présente, aussi bien sous forme phosphorylée que sous forme totale une abondance supérieure dans les conditions UVB tout au long de la cinétique.

Dans la littérature, il est décrit que la protéine ATM est activée suite à la présence de cassures double brins (Stiff et al., 2004) alors que ATR est activée suite aux cassures simple brins (Zou et al., 2004). Cependant, l'exposition des cellules aux UVB mène à des cassures doubles brins, comme nous l'avons observé par le marquage au P-H₂AX. Ceci explique donc l'activation de la forme phosphorylée d'ATM. Or, les UVB peuvent également induire la formation de dommages indirects à l'ADN via la formation de ROS. Les dommages occasionnés sont alors

principalement des modifications de bases de l'ADN, et principalement de la guanine. Un dommage considéré comme marqueur des dommages oxydatifs est le 8-oxodG. Ce type de dommages sur l'ADN mène à la formation de cassures simple brin, et donc à l'activation de ATR. De plus, la littérature suggère que la protéine ATR peut répondre à un grand nombre de dommages, à condition que ceux-ci soient transformés en intermédiaire d'ADN simple brin.

Pour BRCA1, l'activation de la forme phosphorylée observée au temps court pourrait être expliquée par son rôle de médiateur. En effet, BRCA1 permet de faciliter l'accumulation locale des facteurs de réparation près des dommages afin de promouvoir leur phosphorylation menant à une réparation plus efficace (d'Adda di Fagagna et al., 2004). Ce rôle ponctuel peut expliquer la détection de cette protéine aux temps courts qui diminue rapidement au temps plus longs.

Pour les kinases en aval de la DDR, CHK1 et CHK2, ayant comme rôle de transmettre le signal, aux protéines effectrices, on observe une activation longue de CHK2 jusqu'à 72h par rapport à CHK1 (24-48h). Dans la littérature, CHK2 est souvent citée comme substrat direct d'ATM (Zgheib et al., 2005), alors que CHK1 semble plutôt être activée par ATR (Tenorio-Gomez et al., 2015).

Finalement une augmentation de la forme phosphorylée de p53 de manière persistante au sein des kératinocytes en UVB-SIPS peut être expliqué par le fait que p53 est un des effecteurs principaux, activé en fin de la voie de la DDR (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Son activation importante dans les cellules en SIPS-UVB mène à l'arrêt du cycle cellulaire également de manière persistante. De plus, l'augmentation de l'abondance de la forme totale de p53 confirme cette hypothèse. En effet, p53 joue un rôle clé dans l'arrêt du cycle cellulaire transitoire ou permanent notamment via l'induction de l'expression de p21^{WAF-1} (Reinhardt and Schumacher, 2012). Les dommages à l'ADN sont observés de manière persistante au sein des kératinocytes ainsi que la voie DDR. Celle-ci pourrait donc être impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire via l'activation de p53 et la surexpression subséquente de p21^{WAF-1}.

Finalement, nous avons réalisé une étude préliminaire du stress oxydatifs dans les kératinocytes normaux humains en SIPS-UVB. Les résultats obtenus par FACS suggèrent qu'il existe une augmentation de la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) en SIPS-UVB, en comparaison avec les cellules contrôles. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, les molécules photosensibles, telles que le NADH/NADPH, la riboflavine, la porphyrine ou encore le tryptophane peuvent être excitées par les rayons UVB, et transmettre leurs énergie à des molécules d'oxygène aboutissant à la formation de ROS (Hiraku et al., 2007). Les ROS peuvent induire différentes voies de signalisation. Nous nous sommes intéressés à l'activation du facteur de transcription Nrf2. Ce facteur de transcription est décrit dans la littérature pour réguler l'expression d'enzymes antioxydants. En condition normale, ce facteur est séquestré dans le cytoplasme des cellules. Lors d'un stress oxydatif, il est phosphorylé, et transloqué dans le noyau où il induit l'expression de gènes codant pour des molécules impliquées dans la réponse aux stress oxydatifs (Hayes et al., 2010). Les résultats montrent un marquage nucléaire intense dans les conditions UVB à 24h. L'expression de Nrf2 est maintenue jusqu'à 72h avec une localisation nucléaire et cytoplasmique. Ceci indique que la production de ROS chez les kératinocytes induit l'activation du facteur de transcription qui transloque au sein du noyau afin de favoriser l'expression de gènes antioxydants codant des protéines. Ces résultats n'ont été réalisés qu'une fois et sont donc préliminaires. Il serait donc judicieux de confirmer ceux-ci par des réplicats avant de pouvoir tirer des conclusions de manière plus précise.

Pour résumer cette deuxième partie, il a été observé que les kératinocytes en SIPS-UVB présentent des dommages à l'ADN persistants après 72h. Ceci mène à l'activation de la voie DDR. De plus, nous avons également pu observer une augmentation de la production des ROS dans les conditions de SIPS-UVB, et une induction l'activation du facteur de transcription Nrf2.

A partir des résultats obtenus durant ce mémoire, plusieurs perspectives peuvent être envisagées.

De manière générale, comme déjà précisé, il serait important de confirmer certains résultats obtenus à la suite d'une seule expérience, ou à la suite d'expériences donnant des résultats variables suivant les donneurs, par la réalisation des répliques (donneurs différents). En effet, ceci permettrait de donner des réponses définitives à des données démontrant des tendances et pour lesquelles les résultats ne sont pas encore significatifs.

En ce qui concerne l'arrêt du cycle cellulaire, il serait intéressant à voir, à quelle phase du cycle les cellules arrêtent leur progression de manière permanente. En effet, les CDKI p16^{Ink4a} et p21^{WAF-1} sont des suppresseurs des complexes de cycline-CDK2, -CDK1 ainsi que -CDK4/6. Cette suppression mène à un arrêt en phase G1. Le but serait de compléter l'étude du cycle cellulaire pour voir, si les kératinocytes normaux humain en SR et en SIPS-UVB présentent, ou pas, un arrêt du cycle en phase G1 ou si l'arrêt est observé à une autre phase du cycle. Les fibroblastes sont connus pour arrêter leur cycle en phase G1/S. L'analyse pourrait être réalisée par cytométrie de flux, basée sur l'intercalation d'iodure de propidium dans l'ADN. Cette technique permet de déterminer la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules, par l'analyse de leur contenu en ADN (Cecchini, et al., 2012).

De plus, il serait intéressant de comprendre la distinction entre les voies amenant à l'arrêt du cycle cellulaire en SR (p16^{INK4A}-dépendante) et en SIPS-UVB (p21^{WAF-1}-dépendante). Ainsi, une analyse plus fine de l'expression des différents acteurs de ces deux voies pourrait être investiguée. On pourrait notamment étudier la phosphorylation de p53 lors de la sénescence répliquative, ainsi que l'hypophosphorylation de pRb et l'activation d'E2F et d'ATF-2 en SR et en SIPS-UVB. Une fois les partenaires activés identifiés, leur lien avec l'arrêt du cycle cellulaire pourrait être mis en évidence par une inhibition spécifique en utilisant des inhibiteurs chimiques ou des siRNA. L'implication de ces partenaires sur l'arrêt irréversible du cycle cellulaire pourrait alors être étudié en suivant la prolifération par incorporation de thymidine tritiée, et en mesurant leur impact sur les doublements de population cumulés. Cette investigation permettrait de compléter les connaissances sur l'arrêt du cycle dans les kératinocytes en SR et en SIPS-UVB.

Pour l'étude des stress oxydatifs occasionnés chez les kératinocytes en SIPS-UVB, il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres sondes, spécifiques à un type de ROS, permettant une analyse précise des ROS générés. Par exemple, les sondes MitoSOX spécifiques à l'O₂⁻ ou encore les sondes Amplex Red spécifiques pour l'H₂O₂ pourraient être utilisées (Passos et al., 2013). La caractérisation du stress oxydatif généré par la SIPS-UVB permettrait d'étudier des voies de signalisation, activées par ce stress. En effet, de nombreuses études suggèrent que les ROS favorisent l'activation de facteurs de transcription tels que AP-1 et NFκB. De plus l'exposition aux UV semble, suite à l'apparition de ROS, altérer les voie de c-Jun et p38 MAPK. Ces informations peuvent suggérer l'intérêt d'étudier ces voies dans les kératinocytes en SIPS-UVB (Gupta et al., 1999).

De plus, les stress oxydatifs induisent des dommages au niveau des bases de l'ADN, tels que le 8-oxodG (marqueur des dommages oxydatifs) (Hiraku et al., 2007). Il serait donc intéressant d'observer, si ces dommages sont présents dans les kératinocytes en SIPS-UVB.

Ceci avait déjà été envisagé durant ce mémoire, par marquage immunofluorescent, mais sans succès. Afin de remédier à ce problème, il serait nécessaire de faire des nouvelles mises au point, de vérifier l'efficacité des contrôles positifs ou de tester d'autres anticorps.

Durant ce mémoire, nous nous sommes également intéressés à l'étude descriptive de l'activation de la voie de la sénescence au sein du kératinocytes en SIPS-UVB.

Il serait donc intéressant d'étudier, par la suite, les mécanismes et les effets de cette voie dans la sénescence. Pour ce faire, certains acteurs tels qu'ATM ou ATR, activés en amont de la voie, pourraient être inhibés notamment via l'utilisation des siRNA spécifiques les ciblant. On pourrait ainsi voir si leur activation est impliquée dans l'activation séquentielle des partenaires de la DDR et voir si elle est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en SIPS-UVB. De plus une étude des biomarqueurs de la sénescence investigués durant ce mémoire pourrait être entreprise afin de voir si la DDR a un impact sur les autres biomarqueurs. En effet, il a été observé que l'existence des dommages à l'ADN et l'activation persistante de la voie de DDR serait impliquée dans l'induction du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Dans les fibroblastes sénescents, la DDR promeut principalement la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6 et IL-8) (Rodier et al., 2009).

Ainsi, il pourrait être intéressant d'analyser, si l'inhibition (ou la surexpression) de la voie de la DDR montre des conséquences dans l'établissement du SASP en SIPS-UVB. Les changements d'expression des gènes peuvent être analysés par approche « a priori » (en décidant d'analyser par exemple les gènes IL-6 ou IL-8). De plus une approche « sans a priori » pourrait être envisagée en utilisant des cartes microfluidiques permettant l'analyse de l'expression d'un plus grand nombre de gènes. Ceci pourrait permettre de trouver des éventuelles nouvelles cibles qui seront influencées par l'inhibition ou la surexpression de la DDR, ce qui permettrait d'approfondir les études mécanistiques de la voie et de ses effets dans les kératinocytes.

Finalement, il pourrait être intéressant d'étudier la communication des kératinocytes sénescents avec les cellules avoisinantes (kératinocytes normaux, mélanocytes, cellules cancéreuses, ...) ainsi que d'étudier les conséquences de l'activité de la DDR et de l'influence du SASP sur les cellules avoisinantes.

Pour ce faire, on pourrait avoir recours à différentes conditions de co-cultures (kératinocytes sénescents avec kératinocytes normaux, mélanocytes, cellules cancéreuses, ...). Celles-ci permettraient d'étudier, si une communication entre les cellules est observée ou non. Pour ce faire, l'analyse des biomarqueurs peut être à nouveau investiguée. De plus, si des éventuelles communications sont effectivement observées par l'effet d'une expression de la DDR et du SASP en temps normal, l'étude pourrait être menée plus loin en investiguant les conséquences d'une surexpression ou d'une inhibition de la voie de DDR sur les comportements des cellules avoisinantes mises en contact avec ce SASP.

BIBLIOGRAPHIE

- ABOUSSEKHRA, A. & WOOD, R. D. 1995. Detection of nucleotide excision repair incisions in human fibroblasts by immunostaining for PCNA. *Exp Cell Res*, 221, 326-32.
- ACOSTA, J. C. & GIL, J. 2012. Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends Cell Biol*, 22, 211-9.
- ADAMS, P. D. 2009. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell*, 36, 2-14.
- AFAQ, F. & MUKHTAR, H. 2001. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B*, 63, 61-9.
- AZZAM, E. I., DE TOLEDO, S. M. & LITTLE, J. B. 2001. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 473-8.
- BAUMANN, L. 2007. Skin ageing and its treatment. *J Pathol*, 211, 241-51.
- BAXTER, R. C. 2001. Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *Mol Pathol*, 54, 145-8.
- BITTO, A., SELL, C., CROWE, E., LORENZINI, A., MALAGUTI, M., HRELIA, S. & TORRES, C. 2010. Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp Cell Res*, 316, 2961-8.
- BLANPAIN, C. & FUCHS, E. 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 207-17.
- BREITKREUTZ, D., MIRANCEA, N. & NISCHT, R. 2009. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol*, 132, 1-10.
- BURKLE, A., MORENO-VILLANUEVA, M., BERNHARD, J., BLASCO, M., ZONDAG, G., HOEIJMAKERS, J. H., TOUSSAINT, O., GRUBECK-LOEBENSTEIN, B., MOCCHEGIANI, E., COLLINO, S., GONOS, E. S., SIKORA, E., GRADINARU, D., DOLLE, M., SALMON, M., KRISTENSEN, P., GRIFFITHS, H. R., LIBERT, C., GRUNE, T., BREUSING, N., SIMM, A., FRANCESCHI, C., CAPRI, M., TALBOT, D., CAIAFA, P., FRIGUET, B., SLAGBOOM, P. E., HERVONEN, A., HURME, M. & ASPINALL, R. 2015. MARK-AGE biomarkers of ageing. *Mech Ageing Dev*, 151, 2-12.
- CAMPBELL 2007. *Biologie*, Pearson education.
- CAMPISI, J., ANDERSEN, J. K., KAPAH, P. & MELOV, S. 2011. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*, 21, 354-9.
- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- CHEN, Q. M., TU, V. C., CATANIA, J., BURTON, M., TOUSSAINT, O. & DILLEY, T. 2000. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci*, 113 (Pt 22), 4087-97.
- CHU, H. A., HOLBROOK KAREN, LOOMIS CYNTHIA 2008. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, New York, Mc Graw-Hill.
- CLYDESDALE, G. J., DANDIE, G. W. & MULLER, H. K. 2001. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol*, 79, 547-68.
- COPPE, J. P., DESPREZ, P. Y., KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 5, 99-118.

- COPPE, J. P., KAUSER, K., CAMPISI, J. & BEAUSEJOUR, C. M. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*, 281, 29568-74.
- CRICKX, B. 2005. comprendre la peau. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 132, 3-15.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*, 8, 512-22.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F., TEO, S. H. & JACKSON, S. P. 2004. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev*, 18, 1781-99.
- DAYA-GROSJEAN, L., DUMAZ, N. & SARASIN, A. 1995. The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J Photochem Photobiol B*, 28, 115-24.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., BORLON, C., PASCAL, T., ROYER, V., ELIAERS, F., NINANE, N., CARRARD, G., FRIGUET, B., DE LONGUEVILLE, F., BOFFE, S., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2005. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*, 118, 743-58.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J. D., CAMPISI, J. & TOUSSAINT, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4, 1798-806.
- DEGRASSI, F., FIORE, M. & PALITTI, F. 2004. Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 4, 317-25.
- DERUY, E., NASSOUR, J., MARTIN, N., VERCAMER, C., MALAQUIN, N., BERTOUT, J., CHELLI, F., POURTIER, A., PLUQUET, O. & ABBADIE, C. 2014. Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion. *Cell Death Dis*, 5, e1577.
- DIMRI, G. P., ITAHANA, K., ACOSTA, M. & CAMPISI, J. 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol*, 20, 273-85.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- DIZDAROGLU, M., JARUGA, P., BIRINCIUGLU, M. & RODRIGUEZ, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, 32, 1102-15.
- DRONKERT, M. L., BEVERLOO, H. B., JOHNSON, R. D., HOEIJMAKERS, J. H., JASIN, M. & KANAAR, R. 2000. Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol*, 20, 3147-56.
- DUMONT, P., BURTON, M., CHEN, Q. M., GONOS, E. S., FRIPPIAT, C., MAZARATI, J. B., ELIAERS, F., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, 28, 361-73.
- EVENO, E., BOURRE, F., QUILLIET, X., CHEVALLIER-LAGENTE, O., ROZA, L., EKER, A. P., KLEIJER, W. J., NIKAIDO, O., STEFANINI, M., HOEIJMAKERS, J. H. & ET AL. 1995. Different removal of ultraviolet photoproducts in genetically related xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy diseases. *Cancer Res*, 55, 4325-32.
- FONTANA, L., PARTRIDGE, L. & LONGO, V. D. 2010. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*, 328, 321-6.

- FREINKEL, W. 2001. *The Biology of the skin*, the parthenon publishing group limited.
- FREUND, A., ORJALO, A. V., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2010. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*, 16, 238-46.
- FRIED, L. P., TANGEN, C. M., WALSTON, J., NEWMAN, A. B., HIRSCH, C., GOTTDIENER, J., SEEMAN, T., TRACY, R., KOP, W. J., BURKE, G., MCBURNIE, M. A. & CARDIOVASCULAR HEALTH STUDY COLLABORATIVE RESEARCH, G. 2001. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56, M146-56.
- GILLET, L. C. & SCHARER, O. D. 2006. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*, 106, 253-76.
- GONOS, E. S., DERVENTZI, A., KVEIBORG, M., AGIOSTRATIDOU, G., KASSEM, M., CLARK, B. F., JAT, P. S. & RATTAN, S. I. 1998. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res*, 240, 66-74.
- GOSSELIN, K., MARTIEN, S., POURTIER, A., VERCAMER, C., OSTOICH, P., MORAT, L., SABATIER, L., DUPREZ, L., T'KINT DE ROODENBEKE, C., GILSON, E., MALAQUIN, N., WERNERT, N., SLIJEPCEVIC, P., ASHTARI, M., CHELLI, F., DERUY, E., VANDENBUNDER, B., DE LAUNOIT, Y. & ABBADIE, C. 2009. Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res*, 69, 7917-25.
- GUNATHILAKE, R. 2015. The Human Epidermal Antimicrobial Barrier: Current Knowledge, Clinical Relevance and Therapeutic Implications. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 10, 84-97.
- GUPTA, A., ROSENBERGER, S. F. & BOWDEN, G. T. 1999. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignant progressed mouse keratinocyte cell lines. *Carcinogenesis*, 20, 2063-73.
- HANSON, K. M. & SIMON, J. D. 1998. Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10576-8.
- HAYES, J. D., MCMAHON, M., CHOWDHRY, S. & DINKOVA-KOSTOVA, A. T. 2010. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal*, 13, 1713-48.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- HEILSKOV, S., VESTERGAARD, C., BABIREKERE, E., RITZ, C., NAMUSOKE, H., RYTTER, M. & DELEURAN, M. 2015. Characterization and scoring of skin changes in severe acute malnutrition in children between 6 months and 5 years of age. *J Eur Acad Dermatol Venereol*.
- HIATT 2012. *atlas en couleur d'histologie*, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- HIRAKU, Y., ITO, K., HIRAKAWA, K. & KAWANISHI, S. 2007. Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism. *Photochem Photobiol*, 83, 205-12.
- HOCHEGGER, H., TAKEDA, S. & HUNT, T. 2008. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 910-6.
- HOLT, I. J. & REYES, A. 2012. Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- HSIEH, R. H., HOU, J. H., HSU, H. S. & WEI, Y. H. 1994. Age-dependent respiratory function decline and DNA deletions in human muscle mitochondria. *Biochem Mol Biol Int*, 32, 1009-22.
- ITO, K., HIRAKU, Y. & KAWANISHI, S. 2007. Photosensitized DNA damage induced by NADH: site specificity and mechanism. *Free Radic Res*, 41, 461-8.

- ITOH, K., WAKABAYASHI, N., KATOH, Y., ISHII, T., IGARASHI, K., ENGEL, J. D. & YAMAMOTO, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13, 76-86.
- IYAMA, T. & WILSON, D. M., 3RD 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, 12, 620-36.
- JACOBS, J. J. & DE LANGE, T. 2004. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol*, 14, 2302-8.
- JAMES, W. D. & KLIGMAN, A. M. 2006. Back to basics: local care for skin disease. *Cutis*, 78, 389-90.
- JEPPESEN, D. K., BOHR, V. A. & STEVNSNER, T. 2011. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 94, 166-200.
- JUN, J. I. & LAU, L. F. 2010. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging (Albany NY)*, 2, 627-31.
- KAMENISCH, Y., WENZ, J., METZLER, G., BAUER, J., NEUBAUER, H., GARBE, C., ROCKEN, M. & BERNEBURG, M. 2007. The mitochondrial DNA common deletion is present in most basal and squamous cell carcinoma samples isolated by laser capture microdissection but generally at reduced rather than increased levels. *J Invest Dermatol*, 127, 486-90.
- KAMMEYER, A. & LUITEN, R. M. 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*, 21, 16-29.
- KANG, M. K., KAMETA, A., SHIN, K. H., BALUDA, M. A., KIM, H. R. & PARK, N. H. 2003. Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes. *Exp Cell Res*, 287, 272-81.
- KANITAKIS, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 12, 390-9; quiz 400-1.
- KIM, K. S., KIM, J. E., CHOI, K. J., BAE, S. & KIM, D. H. 2014. Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells. *Int J Radiat Biol*, 90, 71-80.
- KISSENPFENNIG, A., HENRI, S., DUBOIS, B., LAPLACE-BUILHE, C., PERRIN, P., ROMANI, N., TRIPP, C. H., DOUILLARD, P., LESERMAN, L., KAISERLIAN, D., SAELEND, S., DAVOUST, J. & MALISSEN, B. 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*, 22, 643-54.
- KOLARSICK 2011. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3, 203-213.
- KOSTOVIC, K. & LIPOZENCIC, J. 2004. Skin diseases in alcoholics. *Acta Dermatovenerol Croat*, 12, 181-90.
- KRIZHANOVSKY, V., YON, M., DICKINS, R. A., HEARN, S., SIMON, J., MIETHING, C., YEE, H., ZENDER, L. & LOWE, S. W. 2008. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134, 657-67.
- KRTOLICA, A., LAROCQUE, N., GENBACEV, O., ILIC, D., COPPE, J. P., PATIL, C. K., ZDRAVKOVIC, T., MCMASTER, M., CAMPISI, J. & FISHER, S. J. 2011. GROalpha regulates human embryonic stem cell self-renewal or adoption of a neuronal fate. *Differentiation*, 81, 222-32.
- KRTOLICA, A., PARRINELLO, S., LOCKETT, S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12072-7.
- KUILMAN, T., MICHALOGLOU, C., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev*, 24, 2463-79.

- KUMAZAKI, T., KOBAYASHI, M. & MITSUI, Y. 1993. Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp Cell Res*, 205, 396-402.
- KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J. D. 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), 3613-22.
- KYO, S., TAKAKURA, M., FUJIWARA, T. & INOUE, M. 2008. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci*, 99, 1528-38.
- LAMBRUS, B. G., UETAKE, Y., CLUTARIO, K. M., DAGGUBATI, V., SNYDER, M., SLUDER, G. & HOLLAND, A. J. 2015. p53 protects against genome instability following centriole duplication failure. *J Cell Biol*, 210, 63-77.
- LAWLESS, C., WANG, C., JURK, D., MERZ, A., ZGLINICKI, T. & PASSOS, J. F. 2010. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol*, 45, 772-8.
- LIGTHART, G. J., CORBERAND, J. X., FOURNIER, C., GALANAUD, P., HIJMANS, W., KENNES, B., MULLER-HERMELINK, H. K. & STEINMANN, G. G. 1984. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev*, 28, 47-55.
- LIMOLI, C. L., GIEDZINSKI, E., BONNER, W. M. & CLEAVER, J. E. 2002. UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 233-8.
- LIN, A. W., BARRADAS, M., STONE, J. C., VAN AELST, L., SERRANO, M. & LOWE, S. W. 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*, 12, 3008-19.
- LINSKENS, M. H., FENG, J., ANDREWS, W. H., ENLOW, B. E., SAATI, S. M., TONKIN, L. A., FUNK, W. D. & VILLEPONTEAU, B. 1995. Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res*, 23, 3244-51.
- LIPSITZ, L. A. 2002. Dynamics of stability: the physiologic basis of functional health and frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 57, B115-25.
- LIU, D. & HORNSBY, P. J. 2007. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*, 67, 3117-26.
- LIU, D., O'CONNOR, M. S., QIN, J. & SONGYANG, Z. 2004. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem*, 279, 51338-42.
- LIU, J., FANG, H., CHI, Z., WU, Z., WEI, D., MO, D., NIU, K., BALAJEE, A. S., HEI, T. K., NIE, L. & ZHAO, Y. 2015. XPD localizes in mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 43, 5476-88.
- MALACQUIN, N., CARRIER-LECLERC, A., DESSUREAULT, M. & RODIER, F. 2015. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet*, 6, 94.
- MARKOVITSI, D., GUSTAVSSON, T. & BANYASZ, A. 2010. Absorption of UV radiation by DNA: spatial and temporal features. *Mutat Res*, 704, 21-8.
- MARTIN, J. L. & BAXTER, R. C. 1991. Transforming growth factor-beta stimulates production of insulin-like growth factor-binding protein-3 by human skin fibroblasts. *Endocrinology*, 128, 1425-33.
- MAYA-MENDOZA, A., OSTRAKOVA, J., KOSAR, M., HALL, A., DUSKOVA, P., MISTRIK, M., MERCHUT-MAYA, J. M., HODNY, Z., BARTKOVA, J., CHRISTENSEN, C. & BARTEK, J. 2015. Myc and Ras oncogenes engage different

- energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress. *Mol Oncol*, 9, 601-16.
- MIN, B. M., WOO, K. M., LEE, G. & PARK, N. H. 1999. Terminal differentiation of normal human oral keratinocytes is associated with enhanced cellular TGF-beta and phospholipase C-gamma 1 levels and apoptotic cell death. *Exp Cell Res*, 249, 377-85.
- MINTY, F., THURLOW, J. K., HARRISON, P. R. & PARKINSON, E. K. 2008. Telomere dysfunction in human keratinocytes elicits senescence and a novel transcription profile. *Exp Cell Res*, 314, 2434-47.
- MISIASZEK, R., CREAN, C., JOFFE, A., GEACINTOV, N. E. & SHAFIROVICH, V. 2004. Oxidative DNA damage associated with combination of guanine and superoxide radicals and repair mechanisms via radical trapping. *J Biol Chem*, 279, 32106-15.
- MOI, P., CHAN, K., ASUNIS, I., CAO, A. & KAN, Y. W. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9926-30.
- NAKAGAWA, A., KOBAYASHI, N., MURAMATSU, T., YAMASHINA, Y., SHIRAI, T., HASHIMOTO, M. W., IKENAGA, M. & MORI, T. 1998. Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. *J Invest Dermatol*, 110, 143-8.
- PARISI, A. V. & TURNER, J. 2006. Variations in the short wavelength cut-off of the solar UV spectra. *Photochem Photobiol Sci*, 5, 331-5.
- PASSOS, J. F., MIWA, S. & VON ZGLINICKI, T. 2013. Measuring reactive oxygen species in senescent cells. *Methods Mol Biol*, 965, 253-63.
- PATTISON, D. I. & DAVIES, M. J. 2006. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*, 131-57.
- PRIEUR, A., BESNARD, E., BABLED, A. & LEMAITRE, J. M. 2011. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun*, 2, 473.
- RAVANAT, J. L., DOUKI, T. & CADET, J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*, 63, 88-102.
- RAWLINGS, A. V. & MATTS, P. J. 2005. Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol*, 124, 1099-110.
- REINHARDT, H. C. & SCHUMACHER, B. 2012. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet*, 28, 128-36.
- RHEE, S. G. 2006. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312, 1882-3.
- RODEMANN, H. P. 1989. Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro. *Differentiation*, 42, 37-43.
- RODIER, F., COPPE, J. P., PATIL, C. K., HOEIJMAKERS, W. A., MUNOZ, D. P., RAZA, S. R., FREUND, A., CAMPEAU, E., DAVALOS, A. R. & CAMPISI, J. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*, 11, 973-9.
- RULEY, H. E. 1990. Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes. *Cancer Cells*, 2, 258-68.
- SASAKI, H., AKAMATSU, H. & HORIO, T. 1997. Effects of a single exposure to UVB radiation on the activities and protein levels of copper-zinc and manganese superoxide dismutase in cultured human keratinocytes. *Photochem Photobiol*, 65, 707-13.

- SCHEFE, J. H., LEHMANN, K. E., BUSCHMANN, I. R., UNGER, T. & FUNKE-KAISER, H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*, 84, 901-10.
- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.
- SHERR, C. J. & MCCORMICK, F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2, 103-12.
- SIDDIQUI, M. S., FRANCOIS, M., FENECH, M. F. & LEIFERT, W. R. 2015. Persistent gammaH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 766, 1-19.
- SIES, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82, 291-5.
- SIMPSON, C. L., PATEL, D. M. & GREEN, K. J. 2011. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 565-80.
- SINDHU, R. K., WAGNER, F. E. & KIKKAWA, Y. 2003. Induction of cytochrome p450 1A1 and 1B1 by photooxidized tryptophan in transformed human keratinocytes. *Adv Exp Med Biol*, 527, 297-306.
- SOROKA, Y., MA'OR, Z., LESHEM, Y., VEROCHOVSKY, L., NEUMAN, R., BREGEGERE, F. M. & MILNER, Y. 2008. Aged keratinocyte phenotyping: morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals. *Exp Gerontol*, 43, 947-57.
- STIFF, T., O'DRISCOLL, M., RIEF, N., IWABUCHI, K., LOBRICH, M. & JEGGO, P. A. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*, 64, 2390-6.
- SULLI, G., DI MICCO, R. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2012. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*, 12, 709-20.
- SVOBODOVA, A., WALTEROVA, D. & VOSTALOVA, J. 2006. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150, 25-38.
- TAGASHIRA, H., MIYAMOTO, A., KITAMURA, S., TSUBATA, M., YAMAGUCHI, K., TAKAGAKI, K. & IMOKAWA, G. 2015. UVB Stimulates the Expression of Endothelin B Receptor in Human Melanocytes via a Sequential Activation of the p38/MSK1/CREB/MITF Pathway Which Can Be Interrupted by a French Maritime Pine Bark Extract through a Direct Inactivation of MSK1. *PLoS One*, 10, e0128678.
- TAKEUCHI, S., TAKAHASHI, A., MOTOI, N., YOSHIMOTO, S., TAJIMA, T., YAMAKOSHI, K., HIRAO, A., YANAGI, S., FUKAMI, K., ISHIKAWA, Y., SONE, S., HARA, E. & OHTANI, N. 2010. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res*, 70, 9381-90.
- TENORIO-GOMEZ, M., DE SENA-TOMAS, C. & PEREZ-MARTIN, J. 2015. MRN- and 9-1-1-Independent Activation of the ATR-Chk1 Pathway during the Induction of the Virulence Program in the Phytopathogen *Ustilago maydis*. *PLoS One*, 10, e0137192.
- THIELE, J. J. 2001. Oxidative targets in the stratum corneum. A new basis for antioxidative strategies. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14 Suppl 1, 87-91.
- TOUSSAINT, O., HOUBION, A. & REMACLE, J. 1992. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech Ageing Dev*, 65, 65-83.

- TOUSSAINT, O., MEDRANO, E. E. & VON ZGLINICKI, T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, 35, 927-45.
- TRAUTINGER, F. 2001. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol*, 26, 573-7.
- TYRRELL, R. M. & PIDOUX, M. 1986. Endogenous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near-visible radiations. *Photochem Photobiol*, 44, 561-4.
- VAN DEURSEN, J. M. 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509, 439-46.
- VERMEIJ, W. P., HOEIJMAKERS, J. H. & POTHOF, J. 2014. Aging: not all DNA damage is equal. *Curr Opin Genet Dev*, 26, 124-30.
- VIALARD, J. F., LACOMBE, F., BELLOC, F., PELLEGRIN, J. L. & REIFFERS, J. 2001. [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiother*, 5, 109-29.
- VIERKOTTER, A., SCHIKOWSKI, T., RANFT, U., SUGIRI, D., MATSUI, M., KRAMER, U. & KRUTMANN, J. 2010. Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *J Invest Dermatol*, 130, 2719-26.
- VINAGRE, J., PINTO, V., CELESTINO, R., REIS, M., POPULO, H., BOAVENTURA, P., MELO, M., CATARINO, T., LIMA, J., LOPES, J. M., MAXIMO, V., SOBRINHO-SIMÕES, M. & SOARES, P. 2014. Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker? *Virchows Arch*, 465, 119-33.
- VISIOLI, F., BELLOMO, G. & GALLI, C. 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*, 247, 60-4.
- VON ZGLINICKI, T., SARETZKI, G., LADHOFF, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F. & JACKSON, S. P. 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev*, 126, 111-7.
- WANG, Z. Y., HUANG, M. T., LOU, Y. R., XIE, J. G., REUHL, K. R., NEWMARK, H. L., HO, C. T., YANG, C. S. & CONNEY, A. H. 1994. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Res*, 54, 3428-35.
- WEI, S., WEI, S. & SEDIVY, J. M. 1999. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res*, 59, 1539-43.
- WILSON, D. M., 3RD & BOHR, V. A. 2007. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*, 6, 544-59.
- WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POOR, I., NADERI, L., MA, W., SCHNEIDER, L. A., RAZI-WOLF, Z., SCHULLER, J. & SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B*, 63, 41-51.
- XIN, H., LIU, D. & SONGYANG, Z. 2008. The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biol*, 9, 232.
- YIN, L., MORITA, A. & TSUJI, T. 2000. Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch Dermatol Res*, 292, 188-94.
- ZGHEIB, O., HUYEN, Y., DITULLIO, R. A., JR., SNYDER, A., VENERE, M., STAVRIDIS, E. S. & HALAZONETIS, T. D. 2005. ATM signaling and 53BP1. *Radiother Oncol*, 76, 119-22.
- ZOU, Y., SFEIR, A., GRYAZNOV, S. M., SHAY, J. W. & WRIGHT, W. E. 2004. Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? *Mol Biol Cell*, 15, 3709-18.